

05.10.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

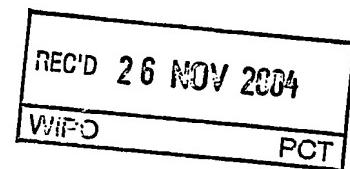
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 9月30日

出願番号
Application Number: 特願 2003-339542
[ST. 10/C]: [JP 2003-339542]

出願人
Applicant(s): 独立行政法人理化学研究所
株式会社ダナフォーム



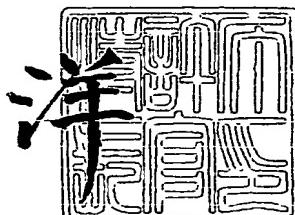
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-054
【提出日】 平成15年 9月30日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N
C12M
C12N

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前22-8
【氏名】 林崎 良英

【発明者】
【住所又は居所】 東京都港区三田一丁目3番35号 株式会社ダナフォーム内
【氏名】 神谷 守

【特許出願人】
【識別番号】 000006792
【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号
【氏名又は名称】 理化学研究所
【代表者】 小林 俊一

【特許出願人】
【住所又は居所】 東京都港区三田一丁目3番35号
【氏名又は名称】 株式会社ダナフォーム

【代理人】
【識別番号】 100098121
【弁理士】 間山 世津子
【氏名又は名称】 045-290-7480

【選任した代理人】
【識別番号】 100107870
【弁理士】 野村 健一
【氏名又は名称】

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 093194
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体。

【請求項 2】

上記保護剤がトレハロース及びその誘導体からなる化合物群より選択される少なくとも一種類の化合物である請求項 1 記載の支持体。

【請求項 3】

上記酵素に対するアプタマーをさらに含む請求項 1 又は 2 に記載の支持体。

【請求項 4】

酵素と当該酵素に対するアプタマーとが固定されている支持体。

【請求項 5】

上記酵素がDNAポリメラーゼである請求項 1 ないし 4 の何れか一項に記載の支持体。

【請求項 6】

さらに、上記DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応で目的とする核酸を増幅するためのプライマーを含んでなる請求項 5 記載の支持体。

【請求項 7】

さらに、上記DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応の錆型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー、及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つを含んでなる請求項 5 に記載の支持体。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 の何れか一項に記載の支持体を含む印刷物。

【請求項 9】

請求項 1 ないし 7 の何れか一項に記載の支持体を含む試薬キット。

【請求項 10】

請求項 1 記載の支持体を製造する方法であつて、酵素及び保護剤の混合溶液を調製し、該溶液を支持体に適用し、該支持体を乾燥することにより、前記酵素及び保護剤の混合物を支持体に固定することを含む前記の方法。

【請求項 11】

請求項 1 ないし 7 の何れか一項に記載の支持体を液体に浸漬させることにより、該液体中に酵素を溶出させることを含む、支持体に固定された酵素を再生する方法。

【請求項 12】

請求項 5 ないし 7 の何れか一項に記載の支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼを溶出させる工程と、当該DNAポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を行うことを特徴とする、核酸の増幅方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】酵素が固定されている支持体、印刷物、試薬キット、該支持体の製造法、酵素の保存法及び酵素の再生法

【技術分野】**【0001】**

本発明は、酵素が固定されている支持体、印刷物、試薬キット、該支持体の製造法、酵素の保存法及び酵素の再生法に関する。

【背景技術】**【0002】**

酵素は触媒活性を有するタンパク質であり、種々の生体反応を司ることにより、生命の維持に貢献している。

【0003】

酵素は、水分を含有した状態では室温で不安定である。それ故、凍結状態で保存されるか、あるいは-20℃以下の温度で安定化剤とともに液体中で保存される。

【0004】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、DNAポリメラーゼという酵素により触媒される核酸增幅反応であるが、DNAポリメラーゼは通常バッファー中で-20℃の温度で保存される。このような保存のためには、冷凍庫が必要である。また、この酵素が供給者から使用者に配送されるにあたっては、ドライアイスとともに発泡スチロールなどの容器に箱詰めされる。これらの保存・配送方法は、特別の設備や作業を要するため、操作が煩雑で費用のかかるものである。

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

本発明は、酵素を保存するための簡便な方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】**【0006】**

本発明者は、DNAポリメラーゼをトレハロースと混合した状態で支持体に固定して保存した後、PCRを行ったところ、PCR反応が進行することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】

本発明の要旨は以下の通りである。

- (1) 酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体。
- (2) 上記保護剤がトレハロース及びその誘導体からなる化合物群より選択される少なくとも一種類の化合物である(1)記載の支持体。
- (3) 上記酵素に対するアプタマーをさらに含む(1)又は(2)に記載の支持体。
- (4) 酵素と当該酵素に対するアプタマーとが固定されている支持体。
- (5) 上記酵素がDNAポリメラーゼである(1)ないし(4)の何れか一項に記載の支持体。
- (6) さらに、上記DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応で目的とする核酸を増幅するためのプライマーを含んでなる(5)記載の支持体。
- (7) さらに、上記DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応の錆型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー、及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つを含んでなる(5)に記載の支持体。
- (8) (1)ないし(7)の何れか一項に記載の支持体を含む印刷物。
- (9) (1)ないし(7)の何れか一項に記載の支持体を含む試薬キット。
- (10) (1)記載の支持体を製造する方法であつて、酵素及び保護剤の混合溶液を調製し、該溶液を支持体に適用し、該支持体を乾燥することにより、前記酵素及び保護剤の混合物を支持体に固定することを含む前記の方法。
- (11) (1)ないし(7)の何れか一項に記載の支持体を液体に浸漬させることによ

り、該液体中に酵素を溶出させることを含む、支持体に固定された酵素を再生する方法。

(12) (5)ないし(7)の何れか一項に記載の支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼを溶出させる工程と、当該DNAポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を行うことを特徴とする、核酸の増幅方法。

【0008】

また、本発明は、酵素を保護剤との混合物として支持体に固定した状態で保存する方法を提供する。

【0009】

さらに、本発明は、上記(7)に記載の支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼと、鑄型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つとを溶出させる工程と、当該DNAポリメラーゼと鑄型となる核酸および/またはプライマーとを用いて核酸増幅反応を行うことを特徴とする、核酸の増幅方法を提供する。

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

本発明は、酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体を提供する。

【0012】

酵素は、何らかの触媒活性を有するものであればいかなるものであってもよく、例えば、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、RNase、制限酵素、メチラーゼ、修飾酵素、ライゲース、プロテアーゼ、キナーゼ、フォスファターゼ、トランスフェラーゼ、グリコシラーゼ、トポイソメラーゼ、クロナーゼなどを例示することができるが、これらに限定されることはない。

【0013】

保護剤は、酵素を乾燥から保護し、安定に保存できるものであればいかなるものであってもよく、トレハロース及びその誘導体、多糖類、PEG、デキストラン、Ficoll、グリセロール、界面活性剤、PVA及びその誘導体などを例示することができる。このうち、トレハロース及びその誘導体が効果的である。

【0014】

保護剤は市販されているものであっても、公知の方法に従って合成したものであってよい。

【0015】

トレハロースは、2分子のD-グルコースが1,1結合した非還元性二糖であり、結合様式としては、 α, α -、 α, β -、 β, β -の3種の異性体がある。

【0016】

トレハロースの誘導体としては、トレハロースの酸エステル（例えば、ラウリン酸エステル、オレイン酸エステル、リノール酸エステル、リノレン酸エステル、ステアリン酸エステル、パルミチン酸エステル、ミリスチン酸エステルなどの脂肪酸エステル、酢酸エステル、安息香酸エステルなどのカルボン酸エステル、硫酸エステルなど）、アルキルエーテル（例えば、炭素数8～25のアルキルとのエーテルなど）、ハライド、含窒素誘導体、含硫黄誘導体などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

【0017】

トレハロース及びその誘導体は市販されているが、公知の方法で製造してもよい。トレハロース及びその誘導体の製法は、シー・ケー・リー『デベロップメント・イン・フード・カルボハイドレート』、1980年、アプライド・サイエンス・パブリッシューズ社発行、第1乃至89頁やケー・ヨシモトら『ケミカル・アンド・ファーマシューティカル・プレティン』、第30巻、第4号、第1, 169乃至1, 174頁（1982年）、特開平8-157491号などに記載されている。

【0018】

酵素1Uに対して、 $10^{-5} \sim 10^1$ M、好ましくは、 $10^{-4} \sim 10^{-1}$ Mの保護剤を

添加して混合するとよい。

【0019】

支持体は、酵素及び保護剤の混合物を固定できるものであればいかなるものであってもよく、例えば、紙（例えば、60MDP紙（三島製紙製）、コピー用紙、上質紙、中質紙、ケント紙、画用紙、クラフト紙、インクジェット専用紙、トレーシングペーパー、和紙、ボール紙、濾紙など）、ガラス基板、シリコン基板、ビース、カラム充填剤、シリカゲル、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、PVA膜などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

【0020】

支持体の厚さは、例えば、1mm以下とすることができます。この厚さを非常に薄くすれば（例えば0.1mm程度）、酵素及び保護剤を固定した支持体を多数枚積層して配布する場合にも、嵩張らないので、その作業性は向上する。

【0021】

支持体には、酵素及び保護剤の他、ポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNA、それらの誘導体、修飾体など）、オリゴヌクレオチド（例えば、DNA、RNA、それらの誘導体、修飾体など）、タンパク質（例えば、抗体、ホルモンなど）、ポリペプチド、オリゴペプチド、多糖、オリゴ糖、PNA、低分子化合物（例えば、EDTA、PCR用バッファー組成に含まれる塩、Mg²⁺、dNTP混合物など）、それらの混合物などが固定されていてもよい。酵素及び保護剤以外の成分は、酵素及び保護剤の混合物と同じ位置で支持体上に固定されてもよいし、酵素及び保護剤とは異なる位置で支持体に固定されてもよい。特に、酵素に対するアブタマーが支持体に固定されているとよく、本発明は、酵素と当該酵素に対するアブタマーとが固定されている支持体も提供するものである。

【0022】

本発明の好ましい態様の一つにおいて、支持体は、DNAポリメラーゼと当該DNAポリメラーゼの保護剤の他、当該DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応で目的とする核酸を増幅するためのプライマーを含む。このような支持体は、genotypingや種の同定などに使用することができる。

【0023】

本発明の別の好ましい態様の一つにおいて、支持体は、DNAポリメラーゼと当該DNAポリメラーゼの保護剤の他、当該DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応（PCRなど）の鑄型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー、及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つを含む。

【0024】

例えば、DNAポリメラーゼを紙（支持体）に固定して保存する場合には、紙には、DNAポリメラーゼ及び保護剤の他、プライマーセット（オリゴヌクレオチド）、PCR反応の鑄型となるDNA（合成の1本鎖又は2本鎖DNAでもよいし、cDNAをクローニングしたベクターでもよい）、DNAポリメラーゼに対するアブタマー（機能性RNA）、PCR反応溶液中の各成分（すなわち、Tris-HCl、KC1、MgCl₁、dNTP混合物など）、EDTAなどを固定してもよい。この場合、（1）DNAポリメラーゼ、保護剤及びプライマーセットを1スポットとして、PCR反応の鑄型となるDNA、Tris-HCl及びEDTAを別のスポットとして紙に固定してもよいし、（2）DNAポリメラーゼ、保護剤及びプライマーセット、必要により、DNAポリメラーゼに対するアブタマーを1スポットとして紙に固定してもよいし、（3）PCR反応に必要なすべての成分（すなわち、PCR反応の鑄型となるDNA、DNAポリメラーゼ、プライマーセット、Tris-HCl、KC1、MgCl₁、dNTP混合物など、必要により、DNAポリメラーゼに対するアブタマー）を保護剤とともに1スポットとして紙に固定してもよい。紙にDNAポリメラーゼなどの成分がスポットティングされていることがわかるように、スポットティングする成分に色素を添加しておくとよい。色素としては、クレゾールレッド、プロモフェノールブルー、キシレンシアノールなどを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

【0025】

支持体に固定する酵素の量は、目的とする酵素反応が行われるように適宜調整するとよい。例えば、PCR反応が行われるようにするために、1スポット当たり5 ng以上のDNAポリメラーゼが固定されるとよい。

【0026】

酵素及び当該酵素の保護剤の混合物が固定されている支持体は以下のようにして製造することができる。まず、酵素及び保護剤の混合溶液を調製する。酵素と保護剤の混合比は上記の通りである。溶媒は水であるといい。さらに、この混合溶液に、酵素及び保護剤以外の上記の成分を添加してもよい。次いで、酵素及び保護剤の混合溶液を支持体に適用する。例えば、支持体が紙である場合には、スポット、96 pin-tool (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US)、ディスポーバルタイプのpin-to olなどを用いて、混合溶液を紙にスポットティングすることができる。その後、支持体を乾燥することにより、酵素及び保護剤の混合物を支持体に固定する。酵素及び保護剤の混合物を固定した支持体は実質的に水を含まないものであるとよい。

【0027】

上記のように、酵素を保護剤との混合物として支持体に固定した状態にすることによって、酵素を安定に保存することができる。保存条件としては、室温で、高湿度を避け、遮光下に保存することが好ましい。例えば、酵素がDNAポリメラーゼである場合、DNAポリメラーゼをトレハロースとの混合物として60MDP紙に固定した状態で室温で保存したとき、少なくとも6か月半の保存寿命が確認されている（現在、まだ保存試験は続行中である）。

【0028】

上記のように、保護剤との混合物として支持体に固定した酵素を再生するには、酵素と保護剤との混合物を固定した支持体を液体に浸漬させ、該液体中に酵素を溶出させればよい。支持体を浸漬させる液体は、酵素の再生を可能とするものであればいかなるものであってもよいが、例えば、水、水以外の成分を含有する水溶液などを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。例えば、支持体に固定した酵素がDNAポリメラーゼである場合、支持体を浸漬させる液体は、水、PCR反応溶液（すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl₂、dNTP混合物などを含有する水溶液）などであるとよい。浸漬は、室温にて大気圧下で、1～3分間行えばよい。

【0029】

支持体にDNAポリメラーゼが固定されている場合には、この支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼを溶出させ、当該DNAポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を行うことにより、核酸を増幅することができる。

【0030】

また、本発明は、酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体を含む印刷物を提供する。

【0031】

印刷物としては、教科書などの成書、ハンドブック、カタログ、定期刊行物、雑誌、論文、冊子、小冊子、リーフレット、パンフレット、報告書、ポスター、カード、ラベルなどを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

【0032】

図1は、本発明の印刷物における、酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポットティングされている紙（支持体）の一例を示す。紙6には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、PCR反応の錫型となるcDNAクローン及び他のPCR反応に必要な成分（すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl₂、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアブタマー）とともにスポットティングされている（以下、このスポットを「DNA Spot」1という）。紙6には、DNA Spot 1の他に、cDNAクローンがコードするタンパク質の名前2（malate dehydrogenaseなど）、cDNAクローンの識別番号3（Clone ID）、cDNAクローンの塩基配列4（DNA sequence）、実験（PCR反応）の手順の説明文5（Procedures）が印刷されている。

【0033】

図2は、図1に示すDNA Spot 1を有する紙6を別紙として添付している学術論文12が掲載されている雑誌13を示す。

【0034】

図3は、図1に示すDNA Spot 1を有する紙6を綴じ込んだ書籍22を示す。この書籍には、さらに、目次が含まれているとよい。

【0035】

図4は、酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポットティングされている紙（支持体）を綴じ込んだ書籍の別の様子を示す。酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポットティングされている頁34の各格子には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、PCR反応の錠型となるcDNAクローン及び他のPCR反応に必要な成分（すなわち、Tris-HCl、KC1、MgCl₁、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアブタマー）とともに、スポットティングされている（以下、このスポットを「DNA Spot」31という。）。これらのスポット31を有する頁34には、スポットを識別するための記号（列番号）32及び（行番号）33が印刷されている。さらに、DNAをスッポッティングした頁の識別番号30（Rearray PLATE ID）が印刷されている。スポットティングされているcDNAクローンに関する情報（例えば、cDNAクローンがコードする酵素のEC number、cDNAクローンがコードする酵素の名前（Gene name）、クローンのID番号（RIKEN Clone ID）、寄託番号（Accession Number）、cDNAクローンインサートの長さ（cDNA Insert）、PCR反応産物の長さ（After PCR）、cDNAクローンがコードする酵素が関与する反応の説明など）及びプライマーセットに関する情報（例えば、プライマーの塩基配列など）はCD-ROM36（CD-ROMの代わりにFD、MOなどの媒体でもよい）に記録されており、これらの記録媒体が書籍に付録として添付されている（図5）。図5においては、CD-ROM36は袋37に入れられ、シール38で封をした状態で書籍35に添付されている。この書籍には、さらに、目次、cDNAクローン及びプライマーセットを含むスポットの使用説明、記録媒体に記録されている情報へのアクセス方法が印刷されている頁が含まれているといい。

【0036】

印刷物の形態としては、1)百科事典タイプの網羅的なもの（例えば、FANTOMクローン、ヒトメタボロームなど）、2)分野ごと（例えば、機能別或いは臓器別等）の分冊型、3)更にテーマというか内容を細分化した1ページから数ページのもの（例えば、ルーズリーフタイプ）、4)より少數の貼付物を想定したカードタイプを例示することができる。

【0037】

さらに、本発明は、酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体を含む試薬キットを提供する。

【0038】

本発明の試薬キットは、核酸增幅反応（例えば、PCR）キット、蛋白発生キット、抗体キット、その他のキットとして、種々の実験、検査、診断などに利用することができる。

【0039】

本発明の試薬キットは、上記のような印刷物の形態をとってもよいが、それ以外の形態の例を図6～9に示す。

【0040】

図6は、本発明の試薬キットにおける、酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポットティングされている紙（支持体）の一例を示す。この紙には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、その他のPCR反応に必要な成分（すなわち、Tris-HCl、KC1、MgCl₁、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアブタマー）とともに、紙の適当な位置にスポットティングされている（以下、このスポットを「DNA Spot」41という）。

【0041】

図7は、図6に示すDNA Spot 4 1を有する紙4 2を含む試薬キットの一例を示す。DNA Spot 4 1を有する紙4 2は遮光ビン5 1に入れられ、蓋5 2で密栓をして保管あるいは流通される。試薬キットには、さらに、キットの内容（例えば、キットに含まれる成分・分量、使用目的、保管方法・有効期限、包装単位など）、使用方法、使用上及び取扱い上の注意、問合せ先などの情報が記載された説明書5 3を含むとよい。説明書5 3は遮光ビン5 1に入れてもよいし、遮光ビン5 1を入れた包装箱（図示せず）に入れてもよい。あるいは、説明書をラベルに印刷して、このラベルを遮光ビン5 1に貼り付けてもよい。

【0042】

図8は、本発明の試薬キットにおける、酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポットティングされている紙（支持体）の一例を示す。この紙6 2には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、その他のPCR反応に必要な成分（すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl₂、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアブタマ）とともに、紙の適当な位置にスポットティングされている（以下、このスポットを「DNA Spot」6 1という）。

【0043】

図9は、DNA Spot 6 1を有する紙6 2を含む試薬キットの一例を示す。DNA Spot 6 1を有する紙6 2は包装パック7 1に入れられ、密封して保管あるいは流通される。試薬キットには、さらに、キットの内容（例えば、キットに含まれる成分・分量、使用目的、保管方法・有効期限、包装単位など）、使用方法、使用上及び取扱い上の注意、問合せ先などの情報が記載された説明書7 2を含むとよい。説明書7 2は包装パック7 1に入れてもよいし、包装パック7 1を入れた包装箱（図示せず）に入れてもよい。あるいは、説明書7 2をラベルに印刷して、このラベルを包装パック7 1又は包装箱に貼り付けてもよい。

【0044】

以上、DNAポリメラーゼをDNAと組み合わせた態様について、本発明を説明したが、本発明はこの態様に限定されるわけではなく、種々の酵素への適用が可能である。

なお、本明細書において、「～」はその前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。

【発明の効果】

【0045】

本発明により、酵素を保存するための簡便な方法が提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0046】

以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0047】

【実施例1】

cDNAクローンとポリメラーゼをスポットしたDNAブック

《プライマーの合成》

下記配列のプライマーセットを従来法により合成した。

プライマーセット1

-21M13:5' -TGTAAAACGACGCCAGT-3' (配列番号1)

1233-Rv:5' -AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3' (配列番号2)

【0048】

《cDNA溶液の調整》

理研クローン (<http://fantom.gsc.riken.go.jp/>) の中から下記の塩基配列で表されるマ

ウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNA（クローンID：1500012M15, 1758bp）をクローニングしたpFLCベクター（図10）を0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようにTE（10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA）に溶解した。

【0049】

マウスリンゴ酸脱水素酵素1500012M15

```

1 cccggttctc tcccagagtc tggccgtg tagaggtgac ctgactgctg gagactgcct
61 tttcagggtc cagagatcggtt cttgcaggta tgcaataatg tctgaaccaa tcagagtcc
121 tgtgactgga gcagctggc aaattgcata ttcaactgtt tacagtattg gaaatggatc
181 tgtctttggg aaagaccagc ccatcattct tgtgctgtt gacatcaccc ccatgatggg
241 tggctggac ggtgtcctga tggaaactgca agactgtgcc cttcccccttc tgcaggatgt
301 cattgcaacg gacaaagaag agattgcctt caaagacctg gatgtggctg tcctagtggg
361 ctccatgcca ataagggaaag gcatggagag gaaggaccta ctgaaagcca atgtgaaaat
421 cttcaaattcc cagggcacag cttggagaa atacgccaag aaatcagttt aggtcattgt
481 tgtggaaac ccagccaata cgaactgcct gacagccctt aagtcagcgc catcgatccc
541 caaggagaat ttcaactgtt tgactcgctt ggaccacaac cgagcaaaat ctcaattgc
601 tcttaaactc ggtgttaaccg ctgtatgtt aaagaatgtc attatctggg gaaatcattc
661 atcgacccag tatccagatg tcaatcatgc caaggtgaaa ctgcaaggaa aggaagtcgg
721 tgtgtatgaa gccctgaaag acgacagctg gctgaaggaa gagttcatca cgactgtgca
781 acagcgttgtt gctgctgtca tcaaggctcg gaagctgtcc agtgcaatgt ctgctgcgaa
841 agccatcgca gaccacatca gagacatctg gtttggaaacc ccagagggag agttcgtgtc
901 gatgggtgtt atctctgtatg gcaactccta tgggtccct gatgacctgc tctactcatt
961 ccctgtcgta atcaagaata agacctggaa gtttggaa ggcctccca ttaatgactt
1021 ctcccgtaa aagatggacc tgacagcaaa ggagctgacc gaggaaaagg agaccgctt
1081 tgagtttctc tcctctgcgt gactagacac tcgtttgac atcagcagac agccgaaggc
1141 tgaggaatca aaatgtcgta ttgaggctca gtaccaaaca gtaataatgc tacattcaaa
1201 ttgtgaacag caaaatattt taaatagtgt gtgcattatg atttggaaa gtctatcatg
1261 ttgttagtgc tgcaatctaa ataaaagtat attcaagtga aaatctctca gactctgttt
1321 ctactttata ttttagtatct tcaggaaaac aagtttgcctt aatagattt aatttactt
1381 ttttaattga ctaaaagaaa taaaatggaa aaatattatg aagttaaagca tttagtctcta
1441 acataaaacaa ggaagccaa tcaatttcag agggatccca ttacttaagt cttaaaggt
1501 tggttcatgt tttgctcata atttgatttt aaaatagct gtaagaaggt tgcagataat
1561 ctatcttctt tatattctat agcagaataa tgaagtctt aatatttgat agccaataat
1621 accacactat taatatttg aagctaaatg tattagaaac ataaaactgt ttttgagtca
1681 gtctgttttc catgagaaga catgcatcat ctttggatgt tttgtgcatt actcagtgca
1741 ataaataacc ataatctc (配列番号3)

```

【0050】

《ポリメラーゼ+プライマー溶液の調整》

Taq DNA polymerase（宝酒造製），トレハロース，プライマーセット1を混合し，最終濃度25 U/ μl Taq DNA polymerase、0.1 Mトレハロース，2 μM プライマーセット1となるように調整した。

【0051】

《DNAのスポットティング》

60MDP紙（三島製紙製）に調整したcDNA溶液とポリメラーゼ+プライマー溶液を96 pin-to-pool (Multi 96-microplate replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US) を用いて，図11に示すように，スポットの位置および種類が判別できるようにスポットした。cDNA溶液は0.5 $\mu\text{l}/\text{スポット}$ ，ポリメラーゼ+プライマー溶液は1 $\mu\text{l}/\text{スポット}$ となるようにした。

【0052】

《DNAの回収と増幅》

スポットティングした用紙を30分以上室温にて乾燥させた後、スポットしたcDNAおよびポリメラーゼ+プライマーを含むようにそれぞれ4 mm × 4 mm の大きさに60MDP紙を切り取りPCR用マイクロチューブに入れた。PCR反応溶液 (10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KC1, 5.3 mM MgCl₂, 200 μM 各dNTP) 25 μlをチューブに加え、次の条件でPCRを行った。

2 min at 94°C

(1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 75sec at 68°C) 29サイクル

15 min at 74°C

【0053】

反応後のチューブより適量を取り、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図12に示す。1800bp付近に見られるバンドが目的とする断片と考えられ、60MDP紙からDNAが溶出し、そのDNAはPCRにより増幅可能であることが判った。

【0054】

[実施例2]

#黄体ホルモン遺伝子を使ったアプタマー+ポリメラーゼの実験

《プライマーの合成》

下記配列のプライマーを従来法により合成した。

プライマーセット1 (ヒト黄体形成ホルモン遺伝子エクソン1増幅するプライマーセット)

HsLH1F : CCAGGGGCTGCTGCTGTTG (配列番号4)

HsLH1R : CATGGTGGGCAGTAGGCC (配列番号5)

プライマーセット2 (ヒト黄体形成ホルモン遺伝子エクソン2増幅するプライマーセット)

HsLH2F : ATGCGCGTGCTGCAGGCG (配列番号6)

HsLH2R : TGC GGATTGAGAAGCCTTATTG (配列番号7)

【0055】

《アプタマーの合成》

次に既知のTaq DNA polymeraseに対するアプタマー (Yun Lin, Sumedha D. Jayasena Inhibition of Multiple Thermostable DNA Polymerases by a Heterodimeric Aptamer Journal of Molecular Biology (1997), Vol. 27, Issue 1, pages 100-11) である下記配列を持つオリゴヌクレオチドを従来法により合成した。

GCCGGCCAATGTACAGTATTGGCCGGC (配列番号8)

【0056】

《プライマー+アプタマー+ポリメラーゼ溶液の調整》

2種類のスポットティング用溶液を調整した。

上記のプライマーセット, Taq DNA polymeraseに対するアプタマー, およびTaq DNA polymeraseを最終濃度, 2 μMプライマーセット, 2 μM Taq DNA polymeraseに対するアプタマー, 25 U/μl Taq DNA polymerase, 0.1 Mトレハロースとなるように混合, 調整したし

た溶液、およびこの組成よりTaq DNA polymeraseに対するアプタマーのみを除いた組成の溶液を調整した。

【0057】

《DNAのスポットティング》

60MDP紙（三島製紙製）に上記により調整したプライマー+アプタマー+ポリメラーゼ溶液を96 pin-tool (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US) を用いて、図13に示すように、スポットの位置および種類が判別できるようにスポットした。スポットティング用溶液は1 μ l/スポットとなるようにした。

【0058】

《DNAの増幅》

スポットティングした用紙を30分以上室温にて乾燥させた後、スポット部分を含むように4 mm x 4 mm の大きさに60MDP紙を切り取りPCR用マイクロチューブに入れた。PCR反応溶液 (10 mM Tris-HCl(pH8.3), 50 mM KC1, 5.3 mM MgCl₂, 200 μ M 各dNTP) 25 μ lと50 ngテンプレートDNA (ヒトゲノムDNA, BD Biosciences Clontech, US社製) をチューブに加え、次の条件でPCRを行った。

3min at 94°C

(30 sec at 94°C, 30 sec at 40°C, 30 sec at 72°C) 50サイクル

15 min at 72°C

【0059】

反応後のチューブより適量を取り、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図14に示す。184bpおよび343bp付近に見られるバンドがそれぞれエクソン1および2の目的とするDNA断片と考えられ、60MDP紙に固定されたプライマーを用いてテンプレートDNAからPCRにより目的とする断片を增幅可能であることが判った。また、Taq DNA polymeraseに対するアプタマーの有無を比較すると、アプタマーを含む反応の方が非特異的な増幅を抑えることが出来ることが判った。

【0060】

【実施例3】

理研cDNAクローン+PCR溶液をスポットしたDNAブック

《プライマーの合成》

下記配列のプライマーセットを従来法により合成した。

プライマーセット1

-21M13 : 5' -TGTAAAACGACGGCCAGT-3' (配列番号1)

1233-Rv: 5' -AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3' (配列番号2)

【0061】

《cDNA溶液の調整》

理研クローン (<http://fantom.gsc.riken.go.jp/>) の中から下記の塩基配列で表されるマウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNA (クローンID: 1500012M15, 1758bp), マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NADP) (クローンID: 1500012E04, 2440bp), マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NAD) (クローンID: E030024J03, 2160bp), マウスオキソグルタル酸脱水素酵素 (クローンID: E430020N12, 3554bp) をクローニングしたpFLCベクター (図10) を1 μ g/ μ l となるようにTE (10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA) に溶解した。

【0062】

マウスリンゴ酸脱水素酵素1500012M15

1 cccgggttctc tcccagagtc tttccgctg tagaggtgac ctgactgctg gagactgcct
 61 ttgcagggtc cagagatcggtt cctgcgtt tgcaataatg tctgaaccaa tcagagtcc
 121 tgtgactgga gcagctggc aaattgcata ttcaactgtt tacagtattt gaaatggatc
 181 tgtctttggg aaagaccagc ccatcattct tgcgtgtt gacatcaccc ccatgatggg
 241 tttctggac ggtgtcctga tggaaactgca agactgtgcc ctccccctt tgcaggatgt
 301 cattgcaacg gacaaagaag agattgcctt caaagacccgt gatgtggctg tccttagtggg
 361 ctccatgcca ataagggaaag gcatggagag gaaggaccta ctgaaaagcca atgtgaaaat
 421 ctcaaatcc cagggcacag ccttggagaa atacgccaag aatcagttt aggtcattgt
 481 tgtggaaac ccagccaata cgaactgcctt gacagcctcc aagtcagcgc catcgatccc
 541 caaggagaat ttcaactgc tgcgttgcgg ggaccacaac cgagcaaaat ctcaaatgc
 601 tcttaaactc ggtgttaaccg ctgtatgtt aaagaatgtc attatctggg gaaatcattc
 661 atcgacccag tatccagatg tcaatcatgc caaggtaaaa ctgcaaggaa aggaagtcgg
 721 tgtgtatgaa gccctgaaag accacagctg gctgaaggaa gagttcatca cgacttgca
 781 acagcgtggt gctgctgtca tcaaggctcg gaagctgtcc agtgcattgt ctgctgcgaa
 841 agccatcgca gaccacatca gagacatctg gtttggacc ccagagggag agttcgtgtc
 901 gatgggtgtt atctctgtatg gcaactccta tgggtccct gatgacctgc tctactcatt
 961 ccctgtcgtg atcaagaata agacctggaa gtttggtaaa ggcctccca ttaatgactt
 1021 ctcccgtaaa aagatggacc tgacagcaaa ggagctgacc gaggaaaagg agaccgctt
 1081 tgggttctc tcctctgcgt gactagacac tcgttttgc atcagcagac agccgaaggc
 1141 tgaggaatca aaatgtcgtc ttgaggccta gtaccaaaca gtaataatgc tacattcaaa
 1201 ttgtgaacag caaaatattt taaaatgtt gtgcattttt atttgtaaaa gtctatcatg
 1261 ttgttagtgc tgcaatctaa ataaaagtat attcaagtga aaatctctca gactctgttt
 1321 ctactttata tttagtatct tcaggaaaac aagtttgc aatagattat aattttactt
 1381 tttaatttca taaaagaaa taaagatggaa aaatattatg aagtaaagca tttagtctca
 1441 acataaaacaa ggaagccaa tcaatttcag agggatccca ttacttaagt ccttaaaggt
 1501 tgggtcatgt ttgcata atttgatttt aaaatttagct gtaagaaggt tgcagataat
 1561 ctatcttctt tatattctat agcagaataa tgaagtctt aatatttgcgat agccaataat
 1621 accacactat taatatttgc aagctaaatgattt tattagaaac ataaaactgt tttttagtca
 1681 gtctgttttcatgagaaga catgcattcat ctgtgtgtt ttgtgcatt actcagtgca
 1741 ataaataacc ataatctc (配列番号3)

【0063】

マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NADP) 1500012E04

1 ggggtgtgcc gctgtcgcccg cggtgaggaa agtggacgcg atggccgggt ccgcgtgggt
 61 gtccaagggtc tctcgctgc tgggtgcatt ccacaacaca aaacaggtga caagaggattt
 121 tgctgggtt gttcagacag taacttaat tcctggagat ggaattggcc cagaaatttc
 181 agcctcgtc atgaagattt ttgtatgtt ccaaagcacc tattcagtgg gaggagcgc
 241 atgtcacagc aattcaagga ccaggaggaa agtggatgtt tccctccaga agccaaggag
 301 tccatggata agaacaagat gggcttgaaa ggcccactaa agaccccaat agccgtggc
 361 catccatcta tgaatctgtt gctcgtaag acatttgcatttttgc tttatgc tttatgc
 421 tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc
 481 gagaacacgg aaggagaata cagtggaaatt gagcatgtga tcgttgc tttatgc
 541 agcatcaaggc tcatcaccgc agaaggcaagc aagcgcatttgc cagatgttgc tttatgc
 601 gctcgaaaca accaccggag caacgtcaca gctgtgcaca aagctaaatcatgaggatgt
 661 tcatgatggc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc
 721 tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc tttatgc
 781 gatgttcttgc tcatgcaaaa tttatgc gacatccttgc tttatgc tttatgc tttatgc
 841 attggagggtc ttgggtgac tccaagtggc aatattggag ccaacgggtt tgccatctt

901 gaatcggttc atgaaacagc cccggacatt gcaggcaagg acatggccaa cccccacggcc
961 ctccctgctta gtgctgtat gatgcttcgc cacatggac ttttgacca tgcatggaaa
1021 atcgaggctg catgtttgc tacaattaag gatggaaaga gcttaacaaa agatctggga
1081 ggcaacgcga agtgctctga cttcacagaa gaaatctgtc gtagagtcaa agacttagat
1141 tagcaactcct gctgggtggat ttgctgcagt cagtcaatca ctccaaaagg ataccctgta
1201 atccctccttgc agggcgccca ccattgggtt gcttgccttgc tgacagagta cggttttgc
1261 atctggcctt ttcttaacaa aacccttgc atggatgcac atgatggccc caggcccttca
1321 ttcaaaagggt tttcccaagt gctgggttgc ttttattgtcc gctgtgtaaa ctttattttg
1381 taaaactgtaa gtgaactgtt tcatttatca ttgttaaccc attttacact tcaggcaaaa
1441 tcattttcctt caactgtaaa tattctgata cagaattaat aagagaagat atttaacttt
1501 ttaacaaaag ccctggattt ttgggtttagt aaaaacaaac tgggaataaaa acagggtttc
1561 aacaatcgca caagataaca ttattctaat actaatgggt acaaaaagaaaa ttactggga
1621 aagttcacag caaaaaaaaactg gtatatttctt taaaatatg gaaataaaagt atttgcctta
1681 tacatgaatt actattaata aaaaatgtaa ctccaagaaaa tccataatga atgatgtaat
1741 ttgttacta catcgtaat ccttgtcaag gccccggatg ctctctgtgt atttgattct
1801 ttggttaccc ttgagattcac tattttgggg gaagagctt cagataaggg agatcactcc
1861 tcactagaca gatcgctcgc attgcgagct gtcagccatg agagccagcc actgcagatc
1921 ccctcccacg tggccacact ccagccagtg ctgcagggtga ccctggaaag gcctggctgc
1981 cccttgactt tccctaaagc aaccagtcac tgcctctgc cccagtagca cccattacag
2041 acttaattgc cgaggtggag ctgactcagc ccacgctcat acaaattcagg ccaagcgggg
2101 gcctgtgtta ccagctgctg accatcagggt tctgcccctc attttccca cagcctctgc
2161 tccacagcat gaacctagcc tttggccac accaaagcca agctgtcttc ccttagccct
2221 tgcacttagtt tgcaaaactcg tggcttgc taatgtaccc tggtcccaag gggatttctt
2281 aacaacagat gtccctgtct gggtcatttt tttaaagctt ttatttggac ttacaatctt
2341 ctgtgttatt tactttaaaa ctgctgcctt ccctgtctca ctggattgtt ctggtagca
2401 gtggcttgg gttcacagta ataaagaact taagaact (配列番号 9)

11

[0064]

マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NAD) E030024J03

1 ggatctaact ggggccggct tattacagct tgtgtgtacg cgccgggtgt agccgggtta
61 ttgaagtaaa aatgtccaga aaaatccaag gaggttctgt ggtggagatg caaggagatg
121 aaatgacacg aatcatttgg gaattgatta aggaaaaact tattcttccc tatgtggAAC
181 tggatctgcA tagctatgtt taggcataA agaatcgta tgccaccaat gaccaggta
241 ccaaagatgc tgcagaggct ataaagaaat acaacgtggg cgtcaagtgt gctaccatca
301 cccccgatga gaagagggtt gaagaattca agttgaaaca aatgtggaaa tcccaaAtg
361 gcaccatccg aaacattctg ggtggcactg tcttcaggga agctattatC tgcaaaaata
421 tccccggct agtgacaggc tggtaaaac ccattcatcat tggccgacat gcatatgggg
481 accaatacag agcaactgat ttgttgttc ctggccctgg aaaagttagag ataacctaca
541 caccaaaaga tggaaactcag aagggtgacat acatggtaca tgacttggaa gaagggtgggt
601 gtgttgccat gggcatgtac aaccaggata agtcaattga agacttgcA cacagtccT
661 tccaaatggc tctgtccaag ggctggcctt tgcataatcag caccaagaac actattctga
721 agaagtatga tggcggttC aaagacatct tccaggagat ctatgacaag aaatacaagt
781 cccagttga agtcagaag atctgctatg aacacaggct catagatgac atggggcccc
841 aagctatgaa giccgaggga ggcttcatct gggctgtaa gaattacgat ggggatgtgc
901 agtcagactc agtcgcccAA ggtttatggct cccttggcat gatgaccagt gtgctgatTT
961 gtccagatgg taagacggta gaagcagagg ctgccccatgg cactgtcaca cgtcactacc
1021 gcatgtacca gaaaggcAA gagacgtcca ccaacccat tgcttccatt ttgcctggT
1081 cccgagggtt agcccacaga gcaaaagcttG ataacaatac tgagctcagc ttcttcgcaa
1141 aggctttggA agacgtctgc attgagacca ttgaggctgg ctttatgact aaggacttgg

1201 ctgcttgcataaaggccta cccaatgtac aacgttctga ctacttgaat acatttgagt
 1261 ttatggacaa acttggagaa aacttgaagg ccaaatttagc tcaggccaa actttaaggt
 1321 caaacctggg cttagaatga gtcttgcgg taacttaggtc cacaggtta cgtattttt
 1381 ttttttttt tagtaacact caagattaaa aacaaaaaatc attttgaat tggtttagaa
 1441 gacaaagttg aactttata tatgtttaca gtcttttc ttttcatac agttattgcc
 1501 acctaataatga atgtggggg gaaatttttt taattgtatt ttattgtgt a tagcagtgt
 1561 aggaattatg ttagtacctg ttcaacaatta actgtcatgt tttctcatgc tctaataatgaa
 1621 atgaccaaaa tcagaagtgc tccaagggtg aacaataagct acagtatggt tccccataag
 1681 gggaaaagag aaactcaattt cccctgttgtt ccatgagtgt gaacactggg gccttgc
 1741 gcaaataatgtg tactgtgtgtt gggagagcta tacagtaagc tcacataaga ctggaacaga
 1801 taggatgtgtgtt gtagctaaaaa tgcatggcag acgttttat aaagagcatg tatgtgtcca
 1861 atataactatg tatattttaa gaccactgga gaattccaag tctagaataa atgcagactg
 1921 gaggattctg ctcttgcatt tctcttctcc tgtgaccagg cctaagtattt atcctacccc
 1981 aagcagtaca tttcacccat gggcaataat gggagctgtt ccgtttggat ttctgctgac
 2041 ctgctgcatt tctttatataatgtgact ttttttccca agaagttgat attaaacact
 2101 attccagtct agtccttcta aactgttaat ttaattaaa atgaagtact aatgactt
 (配列番号10) //

【0065】

マウスオキソグルタル酸脱水素酵素E430020N12

1 ggggggtggag ctgaacggga gacaggtact tggaaaggc ttcaggacaa aatgtttcat
 61 ttaaggactt gtgctgctaa gtaaggcca ttgacagcct cccagactgt taagacattt
 121 tcacaaaaca aaccagcagc aattaggacg tttcaacaga ttccgtgttca ttctgcacct
 181 gtagctgctg aaccatttct tagtggact agttcaact atgtggagga aatgtactgt
 241 gcctgggtgg agaatccaa aagtgtacat aagtcatggg acattttttt ccgaaacacc
 301 aatgctggag ccccacccggg cactgcctac cagagcccccc ttccctgag tcgaagctcc
 361 ctggctacca tggccatgc acagtccctg gtggaaagcac aacctaacgt cgacaaactc
 421 gtggaggacc acttggcggt gcagtctctc atcagggcat atcagatacg agggcaccat
 481 gtagcacagc tggacccccc gggattttg gatgctgatc tggactcctc cgtccccct
 541 gacattatct catccacaga caaaatggg ttctatggcc tacacgagtc tgaccttgac
 601 aaggcttc acttacccac caccacccatc atcgggggac aggagccagc acttcctt
 661 cgggagatca tccgtcggttca ggagatggcc tactgccagc acattgggtt gggatccatg
 721 ttcatatatttggacaa atgcccgttcc atccgacaga agtttggacac ccctggaaatc
 781 atgcagttca ccaatggagga gaagcggacc ttgcgtggcca ggcttggatc atccaccagg
 841 ttggaggatc tccatcagcg aaagtggtcc tcggagaagc gttttggatc ggaaggctgt
 901 gaggtgctga tccctggcc caagacaatc attgatatgt caactcagat gaccctgaag
 961 ctgtcatgtt tggatggcag gtggcagctg agtggagaaa caccttccac aaggatgtt
 1021 tagttgatct ggtgtttat cgacgaaatg gccacaatga gatggacgaa cctatgttta
 1081 cacagccact catgtacaag cagatccgca agcagaagcc tggactgcag aagtatgcag
 1141 aattgctatg ctcccagggt gtcgtcaatc agcctgatc cgaggaggaa atctccaatg
 1201 atgataagat ctgtgaggaa gcatttacca gatccaaaga tgagaagatc ttgcacatca
 1261 agcactggct ggattcccccc tggcctggct ttttccctt ggatggacag cccaggagca
 1321 tgacctgccc ctccactggc ctggaggagg atgtttgtt ccacattggaa aagggtggcca
 1381 gctctgtacc tggatggaaac ttactatcc atggagggtt gggccggatc ttgaagaccc
 1441 gcaagagatc tggacgaaac cggactgggg actggccctt ggcagagatc atggcattt
 1501 gtcactgctt gaaaggcgc atccatgtgc ggctgatgg ccaggatgtt gggccgggca
 1561 ctttcagccca tcgcccaccat gtcgtccatg atcagaatgt tgacaaaaga acctgcattcc
 1621 ccatgaacca ctttggccca aatcaggccc ttacactgtt atgcaacagc tcgctgtctg
 1681 agtacggatc cttggcattt gggctt gatggccatggc tagccctaat gtcgtggatc
 1741 tctggaggc ccagttggat gacttcaaca acatggcaca gtgcatttgcattt gaccaggatca

1801 tctgcccagg acaggcaaag tgggtgcggc agaatggcat tgtgctcctg ctgcctcatg
 1861 gcatggaagg catgggtccc gagcattcct ctgaccgccc agagcggtt ctgcataatgt
 1921 gcaatgatga cccatatgtc ctgcgtgact tgcaggaaga actctttgac atcaatcagc
 1981 tatatgactg caactggatt gtgtcagct gttccacccg tgcaacttc ttccatgtgc
 2041 tgcgacaaca gatcttgctg cccttccgta agccgttaat agtcttcact cccaaatccc
 2101 tcttgcgcca ccgtgaggca agaactatct ttgacgatat gtgcagga acgcacttcc
 2161 agcgtgtat cccagaaaaat ggacatgcag ctcaggaccc tcacaaaagtc aagagacttc
 2221 tcttctgcac tggaagggt tactatgacc tcacccgaga ggcgaaaagcc aggaacatga
 2281 aggaggagggt ggcttattaca aggattgaggc agctatcacc attccccttt gacccctgt
 2341 taaaagaggc tcagaagtat cccaatgctg agctggctg gtgcagga gggcacaaga
 2401 accaaggcta ctatgactat gtcagccaa gacttcgtac caccattgac cgtgctaagc
 2461 ctgtctggta tgctgtccga gaccggcag ctgctccagc cactggcaac aagaaaaacac
 2521 acctgacaga gctgcagcgc tttctggaca cagccttga cctggacgca ttcaagaaat
 2581 tctcttagat gtcctggag ttgatgaggc catggcccccc atgtccatga cgctcttgc
 2641 ttctcaacta aagaatagtg cctcagcact gtccacacgt cccttcgctg tgccacacca
 2701 cccctgttct cataggaatt aagttgtcca ctgcagtgtc cagctgctcc ccggcacat
 2761 gctgcccagg ctgtggcgc ttctctcagg ctgcacaccg ttcatggaga ccggaggag
 2821 cagaataagg aaaggcccc tctcaggaca tcctagagaa ggaaggcagc tctggcccc
 2881 cccatgcccc cagtgcatac ctccaggta ggaacagaac cctatgtggc ttcccagggt
 2941 actagcactc agccctcgta accccatcaag tcgcagattc aaggccagga gtatgttcat
 3001 ctgtcttaggg ccaagctgag agctcatgga ggaactatag ctgcccaggat ttgggagtca
 3061 tcaggatgtt gtgtgaatag agattgtcat ggggtattha gaggacttta gcagtgtatgt
 3121 tagtctagcc ctgctaccct tcttgggtt gggctgtatg tggaaactt accccagcta
 3181 ccacgcctgg agagcttggc tctgagtagc gcccagaagc tccattggct cccaaacgcca
 3241 ggcactgctg cctctggtc ctgctgcctc tgctctcctg accccctcccc agtacttca
 3301 ttttctctgt ttttcccttg aacacacaga agctgttgc gaatttttt ttttctgt
 3361 ccaaggcagg taaaagcag atcagtggat aagagcaagt tgcggcaagg agccagctgt
 3421 ctttcctccc tctttgacc tccactggga cacacctgat ttatatttt tggttaaaaa
 3481 aaaaaaggaa ataaaaaaag aacaaccacc tttgcattgc atcggcttga cccataaaact
 3541 aagtttatcat ggtc (配列番号 11)
 //

【0066】

《cDNA+プライマー+アプタマー+ポリメラーゼ+PCR用バッファー組成溶液の調整》

上記cDNA， プライマーセット1， Taq DNA polymeraseに対するアプタマー， およびTaq DNA polymeraseを最終濃度， 5 μ Mプライマーセット1， 5 μ M Taq DNA polymeraseに対するアプタマー， 50 U/ μ l Taq DNA polymerase， 0.1 Mトレハロース， 250 mM Tris-HCl(pH 8.3)， 1.25 M KC1， 132.5 mM MgCl₂， 5 μ M 各dNTPとなるように調整した。

【0067】

《DNAのスポットティング》

60MDP紙（三島製紙製）に上記により調整した溶液を96 pin-tool (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US) を用いて， 図15に示すように， スポットの位置および種類が判別できるようにスポットした。スポットティング用溶液は1 μ l/スポットとなるようにした。

【0068】

《DNAの増幅》

スポットティングした用紙を30分以上室温にて乾燥させた後， スポット部分を含むように4 mm x 4 mm の大きさに60MDP紙を取り取りPCR用マイクロチューブに入れ， そこに水25 μ l

を加え、次の条件でPCRを行った。

2 min at 94°C
 (1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 75sec at 68°C) 29サイクル
 15 min at 74°C

【0069】

反応後のチューブより適量を取り、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図16に示す。Lane 1はリンゴ酸脱水素酵素のcDNA、Lane 2はイソクエンサン脱水素酵素(NADP)のcDNA、Lane 3はイソクエンサン脱水素酵素(NAD)のcDNA、Lane 4はオキソグルタル酸脱水素酵素のcDNA、左端はサイズマーカーを示す。4種類のcDNAについてそれぞれ目的とする長さの断片が得られ、60MDP紙に固定したcDNA、プライマー、アプタマー、ポリメラーゼ、およびPCR用バッファー組成物に水のみを加えることによりPCR増幅が可能であることが判った。

【0070】

反応後のチューブより適量を取り、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を108に示す。184bpおよび343bp付近に見られるバンドがそれぞれエクソン1および2の目的とするDNA断片と考えられ、60MDP紙に固定されたプライマーを用いてテンプレートDNAからPCRにより目的とする断片を増幅可能であることが判った。また、Taq DNA polymeraseに対するアプタマーの有無を比較すると、アプタマーを含む反応の方が非特異的な増幅を抑えることが出来ることが判った。

【産業上の利用可能性】

【0071】

本発明の支持体は、酵素の保存や流通に利用することができる。また、印刷物及び試薬キットへの応用も可能である。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポットティングされている紙(支持体)の一例を示す。

【図2】DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポットティングされた紙が別紙として添付された学術論文が掲載されている雑誌を示す。

【図3】DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポットティングされた紙を綴じ込んだ書籍の一例を示す。

【図4】DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポットティングされている紙(支持体)を綴じ込んだ書籍の別の態様を示す。

【図5】図4の紙にスポットティングされているcDNAに関する情報が記録されているCD-ROMが袋に入れられ、シールで封をした状態で書籍に添付されている形態を示す。

【図6】DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポットティングされている紙(支持体)の一例を示す。

【図7】図6の紙を含む試薬キットの一例を示す。

【図8】DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポットティングされている紙(支持体)の一例を示す。

【図9】図8の紙を含む試薬キットの一例を示す。

【図10】マウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNAをクローニングしたpFLCベクターの構成を示す。

【図11】マウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNA溶液のスポット及びポリメラーゼ+プライマー溶液のスポットを有する60MDP紙を示す。

【図12】図11のスポットを用いて行ったPCR反応の反応生成物を電気泳動した結果を示す。

【図13】プライマー+アプタマー+ポリメラーゼ溶液のスポットを有する60MDP紙を示す。

【図14】図13のスポットを用いて行ったPCR反応の反応生成物を電気泳動した結果を示す。

【図15】マウスリンゴ酸脱水素酵素、マウスイソクエン酸脱水素酵素（NADP）、マウスイソクエン酸脱水素酵素（NAD）又はマウスオキソグルタル酸脱水素酵素のcDNA+プライマー+アプタマー+ポリメラーゼ+PCR用バッファー組成溶液のスポットを有する60MDP紙を示す。

【図16】図15のスポットを用いて行ったPCR反応の反応生成物を電気泳動した結果を示す。

【符号の説明】

【0073】

1 : DNA Spots

2 : cDNAクローンがコードするタンパク質（malate dehydrogenaseなどの酵素）の名前

3 : cDNAクローンの識別番号

4 : cDNAクローンの塩基配列

5 : 実験の手順の説明文

6 : DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA（cDNA、プライマー、アプタマーなど）とともにスポットティングされている紙

12 : 学術論文

13 : 雑誌

22 : 書籍

30 : DNAがスポットティングされている頁の識別番号

31 : DNA Spots

32 : スpotを認識するための記号1（列番号）

33 : スpotを認識するための記号2（行番号）

34 : DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA（cDNA、プライマー、アプタマーなど）とともにスポットティングされている頁

35 : 書籍

36 : CD-ROM

37 : 袋

38 : シール

41 : DNA Spot

42 : 紙（支持体）

51 : 遮光ピン

52 : 蓋

53 : 説明書

61 : DNA Spots

62 : 紙（支持体）

71 : 包装パック

72 : 説明書

【配列表フリーテキスト】

【0074】

配列番号1は、プライマー-21M13の塩基配列を示す。

配列番号2は、プライマー1233-Rvの塩基配列を示す。

配列番号3は、マウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNAの塩基配列を示す。

配列番号4は、プライマーHsLH1Fの塩基配列を示す。

配列番号5は、プライマーHsLH1Rの塩基配列を示す。

配列番号6は、プライマーHsLH2Fの塩基配列を示す。

配列番号7は、プライマーHsLH2Rの塩基配列を示す。

配列番号8は、Taq DNA polymeraseに対するアプタマーの塩基配列を示す。

配列番号9は、マウスイソクエン酸脱水素酵素(NADP)のcDNAの塩基配列を示す。

配列番号10は、マウスイソクエン酸脱水素酵素(NAD)のcDNAの塩基配列を示す。

配列番号11は、マウスオキソグルタル酸脱水素酵素のcDNAの塩基配列を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Institute of Physical and Chemical Research
Kabushiki Kaisha DNAFORM

<120> Enzyme-fixing supports, printed materials, reagent
kits, a method for preparing the support, a method for
storing an enzyme and a method for renaturing an enzyme

<130> P03-054

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 1

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 2

agcggataaac aatttcacac agga

24

<210> 3

<211> 1758

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

cccggttctc tcccaagagtc tgttccgctg tagaggtgac ctgactgctg gagactgcct 60

tttgcaggtg cagagatcg cttgcagtt tgcaataatg tctgaaccaa tcagagtcc 120
tgtgactgga gcagctggc aaattgcata ttcaactgtt tacagtattt gaaatggatc 180
tgtctttggg aaagaccagg ccatcattct tgtgctgtt gacatcaccc ccatgatggg 240
tggctggac ggtgtcctg tggaactgca agactgtgcc cttccccctt tgcaggatgt 300
cattgcaacg gacaaagaag agattgcctt caaagacctg gatgtggctg tccttagtggg 360
ctccatgcca ataaggaaag gcatggagag gaaggaccta ctgaaagcca atgtaaaat 420
cttcaaatcc cagggcacag cttggagaa atacgccaag aaatcagttt aggtcattgt 480
tgtggaaac ccagccaata cgaactgcct gacagcctcc aagtcaagcgc catcgatccc 540
caaggagaat ttcaatgttgc tgactcgctt ggaccacaac cgagcaaaat ctcaaattgc 600
tcttaaactc ggtgtaaaccg ctgatgtatgtt aaagaatgtc attatctggg gaaatcattc 660
atcgaccagg tatccagatg tcaatcatgc caaggtaaaa ctgcaaggaa aggaagtccg 720
tgtgtatgaa gccctgaaag acgacagctg gctgaaggaa gagttcatca cgactgtgc 780
acagcgtggc gctgctgtca tcaaggctcg gaagctgtcc agtgcaatgt ctgctgcgaa 840
agccatcgca gaccacatca gagacatctg gtttggacc ccagagggag agttcgtgtc 900
gatgggtgtt atctctgtatgt gcaactccta tggtgtccct gatgacctgc tctactcatt 960
ccctgtcggt atcaagaata agacctggaa gtttggtaa ggcctccccca ttaatgactt 1020
ctcccgtaa aagatggacc tgacagcaaa ggagctgacc gaggaaaagg agaccgttt 1080
tgagtttctc tcctctgcgt gactagacac tcgttttgc atcagcagac agccgaaggc 1140
tgaggaatca aaatgtcgatc ttggacccta gtaccaaaca gtaataatgc tacattcaaa 1200
ttgtgaacag caaaaatattt taaatagtgtt gtgttttatg atttgtaaaa gtctatcatg 1260
ttgttagtgc tgcaatctaa ataaaagtat attcaagtga aaatctctca gactctgttt 1320
ctactttata tttagtatct tcaggaaaac aagtttgcctt aatagattat aattttactt 1380
tttaatttga ctaaaaagaaa taaagatggaa aatattatg aagtaaaagca tttagtctcta 1440
acataaaacaa ggaagcccaa tcaatttcag agggatccccca ttacttaagt ccttaaaggt 1500
tggttcatgt ttgcataattt aaaaatttagt gtaagaagggt tgcaagataat 1560
ctatcttctt tatattctat agcagaataa tgaagtccatt aatattttgat agccaaataat 1620
accacactat taatattttgt aagctaagat tatttagaaac ataaaactgtt ttttgagtca 1680
gtctgttttc catgagaaga catgcataat ctttgcgtt tttgtgcatt actcagtgca 1740
ataaataacc ataatctc 1758

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

ccaggggctg ctgctgttg

19

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5
catggtgggg cagtagcc 18

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6
atgcgcgtgc tgcaggcg 18

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7
tgccgattga gaaggcttta ttg 23

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8
gccggccaat gtacagtatt ggccggc 27

<210> 9
<211> 2438
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 9
gggtgttggcc gctgtcgccg cggtgaggga agtggacgcg atggccgggt ccgcgtgggt 60
gtccaaaggtc tctcggctgc tgggtgcatt ccacaacaca aaacaggtga caagaggttt 120
tgctggtggt gttcagacag taacttaat tcctggagat ggaattggcc cagaaatttc 180

agcctcagtc atgaagattt ttgatgctgg ccaaaggcacc tattcagtgg gaggagcgca 240
atgtcacacgc aattcaagga ccaggaggaa agtgggatga tccctccaga agccaaggag 300
tccatggata agaacaagat gggcttggaaa ggcccactaa agaccccaat agccgttgc 360
catccatcta tgaatctgtt gcttcgttaag acatttgacc tttatgccaa tgtccggcca 420
tgtgtctcaa ttgaaggtt taaaaccct tacacggatg taaatatcgt caccatccga 480
gagaacacgg aaggagaata cagtggatt gagcatgtga tcgttgatgg ggttgcgc 540
agcatcaagc tcattcacca agaagcaagc aagcgcattt cagagttgc cttcgcgtac 600
gctcggaaca accaccggag caacgtcaca gctgtgcaca aagctaacat catgaggatg 660
tcagatggc tcttctgca aaaatgcagg gaagttgcgg agaactgtaa agacattaaa 720
ttaaacgaga tgtaccttga tactgtatgt ttaaatatgg tacaagaccc atcccagttt 780
gatgttcttgc tcatgccaaa ttatcacgg gacatccta gtgatctgtg tgcaggactg 840
attggagggtc ttgggggtgac tccaagtggc aatattggag ccaacgggtg tgccatctt 900
gaatcggtt atggaacagc cccggacatt gcaggcaagg acatggccaa cccacggcc 960
ctcctgctt gtcgtgttat gatgttcgc cacatggac ttttgacca tgcagcaaaa 1020
atcgaggctg catgtttgc tacaattaag gatggaaaga gcttaacaaa agatctggg 1080
ggcaacgcga agtgcgttga cttcacagaa gaaatctgtc gtagagtcaa agacttagat 1140
tagcactcct gctgggttat ttgctgcagt cagtcaatca ctccaaaagg ataccctgta 1200
atcctccctt agggcgccca ccattggtt gcttgcttct tgacagagta cgaaaaatgg 1260
atctggcctt ttcttaacaa aacccttgca atggatgcac atgatggccc caggccttca 1320
ttcaaagggt tttcccaagt gctggttgtt tttattgtcc gtctggtaaa ccttattttg 1380
taaactgtaa gtgaactgtt tcatttatca ttgttaaccc attttacact tcaggcaaaa 1440
tcattttcct caactgtaaa tattctgata cagaattaat aagagaagat atttaacttt 1500
ttaacaaaag ccctggatt ttgggtttag aaaaacaaaac tggaataaaa acagggtttc 1560
aacaatcgca caagataaca ttattctaat actaatgggt acaaaaagaaa ttactggga 1620
aagttcacag caaaaaactg gtatattct taaaaatatg gaaataaaagt atttgccta 1680
tacatgaatt actattaata aaaatgtaaag ctccaagaaaa tccataatga atgatgtaat 1740
tttgttacta catcggtaat cttgtcaag gccccggatg ctctctgtgt atttgattct 1800
tttgttacct tgagattcac tatttgggg gaagagctt cagataaggg agatcactcc 1860
tcactagaca gatcggtcgc attgcgagct gtcagccatg agagccagcc actgcagatc 1920
ccctccacg tggccacact ccagccagtg ctgcaggtga ccctggaaag gcctggctgc 1980
cccttgactt tccctaaagc aaccagtccac tgccttctgc cccagtagca cccattacag 2040
acttaattgc cgaggtggag ctgactcgc ccacgctcat acaaattcagg ccaagcgggg 2100
gcctgtgtt ccagctgctg accatcaggt tctgcccctc attttccca cagcctctgc 2160
tccacacgtt gaaccttagcc tttggccac accaaagcca agctgtcttc ccttagccct 2220
tgcactagtt tgcaaactcg tggcttgc taatgtaccc tggtcccaag gggatttctt 2280
aacaacagat gtccctgtct gggtcatttt tttaaagctt ttatttggac ttacaatctt 2340
ctgtgttattt tactttaaaa ctgctgctt ccctgtctca ctggattgtt ctggtagca 2400
gtggcttgg gttcacagta ataaagaact taagaact 2438

<210> 10
<211> 2160
<212> DNA
<213> Mus musculus

```
<400> 10
ggatctaact ggggccggct tattacagct tgtgtgtacg cgccgggtgtg agccgggtta 60
ttgaagtaaa aatgtccaga aaaatccaag gaggttctgt ggtggagatg caaggagatg 120
aaatgacacg aatcatttgg gaattgatta agaaaaact tattcttccc tatgtggaac 180
tggatctgca tagctatgat tttaggcatacg agaatcgtga tgccaccaat gaccaggta 240
```

ccaaagatgc tgcagaggct ataaagaaat acaacgtggg cgtcaagtgt gctaccatca 300
 ccccccgtga gaagagggtt gaagaattca agttgaaaca aatgtgaaa tccccaaatg 360
 gcaccatccg aaacattctg ggtggcactg tcttcaggga agctattatc tgcaaaaata 420
 tccccccggct agtgacaggc tggtaaaac ccatcatcat tggccgacat gcataatggg 480
 accaatacag agcaactgat tttgttggc ctgggcctgg aaaagttagag ataacctaca 540
 caccaaaaaga tggaaactcag aaggtgacat acatggtaca tgacttga gaaggtggg 600
 gtgtgccat gggcatgtac aaccaggata agtcaattga agacttgca cacagttcct 660
 tc当地atggc tctgtccaag ggctggcctt tgcattctcag caccaagaac actattctga 720
 agaagtatga tggcggttc aaagacatct tccaggagat ctatgacaag aaatacaagt 780
 cccagttga agctcagaag atctgctatg aacacaggct catagatgac atgggtggcc 840
 aagctatgaa gtccgaggga ggcttcatct gggctgtaa gaattacgat ggggatgtgc 900
 agtcagactc agtcgccaa ggttatggct cccttggcat gatgaccagt gtgctgattt 960
 gtccagatgg taagacggtt gaagcagagg ctgcccattgg cactgtcaca cgtcactacc 1020
 gcatgtacca gaaagggcaa gagacgtcca ccaacccat tgcttcatt ttgcctggt 1080
 cccgagggtt agcccacaga gcaaagcttg ataaacaatac tgagctcagc ttcttcgcaa 1140
 aggcttggta agacgtctgc attgagacca ttgaggctgg ctttatgact aaggacttgg 1200
 ctgcttgcatt taaaggctt cccaatgtac aacgttctga ctacttgaat acatttgagt 1260
 ttatggacaa acttggagaa aacttgaagg ccaaatttgc tcaggccaa actttaaggt 1320
 caaacctggg cttagaatga gtcttgcgg taacttagtgc cacaggtta cgtattttt 1380
 ttttttttt tagtaacact caagattaaa aacaaaaatc attttgaat tggtttagaa 1440
 gacaaagttg aactttata tatgtttaaca gtctttttc tttttcatac agttattgcc 1500
 accttaatga atgtgggtgg gaaattttt taattgtatt ttattgtgtt gtagcagtgt 1560
 aggaattatg tttagtacctg ttcacaatta actgtcatgt ttctcatgc tctaattgtaa 1620
 atgaccaaaa tcagaagtgc tccaagggtg aacaatagct acagtatggt tccccataag 1680
 gggaaaagag aaactcactt cccctgttgtt ccatgagtgtt gaacactggg gccttgcac 1740
 gcaaatgtt tactgtgtt gggagagacta tacagtaagc tcacataaga ctggAACAGA 1800
 taggatgtgt gtagctaaaa tgcattggcag acgtgtttt aaagagcatg tatgtgtcca 1860
 atatactagt tatattttaa gaccactgga gaattccaag tctagaataa atgcagactg 1920
 gaggattctg ctcttgcatt tctcttcctc tgtgacccag cctaagtattt atcctacccc 1980
 aagcgtaca ttccacccat gggcaataat gggagctgtt ccgtttggat ttctgctgac 2040
 ctgctgcatt tctttatataatgttact tttttttccc agaagttgtt attaaacact 2100
 attccagtttactt agtcatttca aactgttaat ttttaattaaa atgaagttactt aatgactt 2160

<210> 11
 <211> 3554
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 11

ggggggtggag ctgaacggga gacaggtact tggtaaggc ttcaggacaa aatgtttcat 60
 ttaaggactt gtgctgctaa gtttaaggcca ttgacagcct cccagactgt taagacattt 120
 tcacaaaaca aaccaggcgc aattaggacg ttcaacaga ttccggctt ttcgtcacct 180
 gtagctgctg aaccatttct tagtggact agttcgaact atgtggagga aatgtactgt 240
 gcctgggtgg agaattccaa aagtgtacat aagtcatggg acattttttt ccgaaacacc 300
 aatgtggag ccccacggg cactgcctac cagagcccccc ttccctgag tcgaagctcc 360
 ctggctacca tggccatgc acagtccctg gtggaaagcac aacctaactg cgacaaactc 420
 gtggaggacc acttggcggt gcagtcttc atcagggcat atcagatacg agggcaccat 480
 gtagcagacg tggacccctt ggggattttt gatgctgatc tggactcctc cgtgcccgt 540
 gacattatctt catccacaga caaacttggg ttctatggcc tacacgactc tgaccttgcac 600

aaggcttcc acttacccac caccacttc atcggggac aggagccagc acttccttt 660
 cgggagatca tccgtggct ggagatggcc tactgccagc acattggtgt ggagttcatg 720
 ttcattaatg atttggaaaca atgccagtgg atccgacaga agtttgagac ccctggaatc 780
 atgcagttca ccaatgagga gaagcggacc ttgctggcca ggcttgtacg atccaccagg 840
 tttgaggagt tcctacagcg aaagtggtcc tcggagaagc gttttggct ggaaggctgt 900
 gaggtgctga tccctgcct caagacaatc attgatatgt caactcagat gaccctgaag 960
 ctgtcatgtta tgtatgcaag gtggcagctg agtggagaaa caccttccac aaggatgtt 1020
 tagttgatct ggtgtttat cgacgaaatg gccacaatga gatggacgaa cctatgttta 1080
 cacagccact catgtacaag cagatccgca agcagaagcc tgtactgcag aagtatgcag 1140
 aattgcttagt ctcccagggt gtcgtcaatc agcctgagta cgaggagggaa atctccaagt 1200
 atgataagat ctgtgagggaa gcatttacca gatccaaaga tgagaagatc ttgcacatca 1260
 agcactggct ggattcccccc tggcctggct tttcaccct ggatggacag cccaggagca 1320
 tgacctgccc ctccactggc ctggaggagg atgtttgtt ccacatttga aaggtggcca 1380
 gctctgtacc tgtggagaac ttactatcc atggagggt gagccggatc ttgaagaccc 1440
 gcagagagct tgtgacgaac cggactgtgg actggccct ggcagagtac atggcatttgc 1500
 gctcactgct gaaggaaggc atccatgtgc ggctgagtgg ccaggatgtg gagcggggca 1560
 ctttcagcca tcgcccaccat gtgctccatg atcagaatgt tgacaaaaaga acctgcattcc 1620
 ccatgaacca ctttggcca aatcaggccc ttacactgt atgcaacagc tcgctgtctg 1680
 agtacgggtgt cctggcttt gagctggct ttgccatggc tagcccta at gctctggttc 1740
 tctgggaggc ccagttgggt gacttcaaca acatggcaca gtgcatttgcattt gaccagttca 1800
 tctgcccagg acaggcaaag tgggtgcggc agaatggcat tgtgctctg ctgcctcatg 1860
 gcatggaaagg catgggtccc gaggcatttgc ctgaccggcc agagcggtt ctgcattatgt 1920
 gcaatgatga cccatatgtc ctgcgtgact tgcaggaaacttgcatttgcacttgc 1980
 tatatgactg caactggatt gttgtcagct gttccacccg tggcaacttc ttccatgtgc 2040
 tgcgacaaca gatcttgctg cccttccgtt agccgttaat agtcttact cccaaatccc 2100
 tcttgcgcca ccgtgaggca agaactatct ttgacgatattt gttgccagga acgcacttcc 2160
 agcgtgtgat cccagaaaaat ggacatgcag ctcaggaccc tcacaaagtc aagagacttc 2220
 tcttctgcac tggaaagggt tactatgacc tcacccgaga gcgcaagcc aggaacatga 2280
 aggaggaggt ggcttattaca aggattggc agctatcacc attcccttt gacccctgt 2340
 taaaaagggc tcagaagtat cccaatgtg agtggcctg gtgccaggaa gggcacaaga 2400
 accaaggcta ctatgactat gtcaagccaa gacttcgtac caccatttgc cgtgctaagc 2460
 ctgtctggta tgctgtccga gacccggcag ctgctccagc cactggcaac aagaaaaacac 2520
 acctgacaga gctgcagcgc tttctggaca cagcccttga cctggacgc ttcaagaaaat 2580
 tctcttagat gctcctggag ttgttggc catggccccc atgtccatga cgctcttgc 2640
 ttctcaacta aagaatagt cctcagact gtccacacgt cccttcgtt tgccacacca 2700
 cccctgttct cataggaatt aagttgttca ctgcagtgtt cagctgtcc cccgtcacat 2760
 gctgcccagc ctgtgcccac ttctctcagg ctgcacacccg ttcatggaga ccggaaaggag 2820
 cagaataagg aaaggcccccc tctcaggaca tccttagagaa ggaaggcagc tctggcccca 2880
 cccatgcccc cagtcaatc ctccagggtt ggaacagaac cctatgtggc ttcccagggt 2940
 actagcactc agccctcgtc acccatcaag tcgcagattc aaggccagga gtatttcat 3000
 cttgcttaggg ccaagctgag agctcatgga ggaactatag ctgcccaggat ttgggagtca 3060
 tcaggatgtt gtgtaatag agattgtcat ggggtatata gaggacttta gcagtgtatgt 3120
 tagtcttagcc ctgcttccct tcttgggtt gggctgtatg tggaaactt accccagcta 3180
 ccacgcctgg agagcttggc tctgagtacg gcccagaagc tccattggct cccaaacgcca 3240
 ggcactgcgtg cctcttggtc ctgctgcctc tgctcicctg accccctcccc agtcacttca 3300
 ttttctctgt tgttccctt aacacacaga agctgttgac gaattttttt ttttgctgtg 3360
 ccaaggcagg tcaaaagcag atcagtggat aagagcaagt tgtcccaagg agccagctgt 3420
 ctttcctccc tcctttgacc tccactggaa cacacctgtat ttatattttt tggtaaaaaaa 3480
 aaaaaaggaa atgaaaaaaag aacaaccacc ttgcatttgc atcggcttga cccataaaact 3540
 aagtttatcat ggtc 3554

特願 2003-339542

ページ： 7/E

出証特 2004-3101789

【書類名】図面
【図 1】

Clone 1 cDNA: malate dehydrogenase
Clone ID: 1500012M15

DNA sequence

.....
.....
.....
.....
.....
.....

6

2
3

4

Clone 2 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NAD)
Clone ID: 1500012E04

DNA sequence

.....
.....
.....
.....
.....

Clone 3 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NADP)
Clone ID: E030024J03

DNA sequence

.....
.....
.....
.....
.....

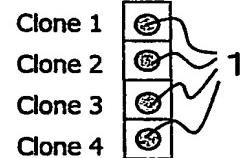
Clone 4 cDNA: oxoglutarate dehydrogenase (lipoamine)
Clone ID: E430020N12

DNA sequence

.....
.....
.....
.....
.....

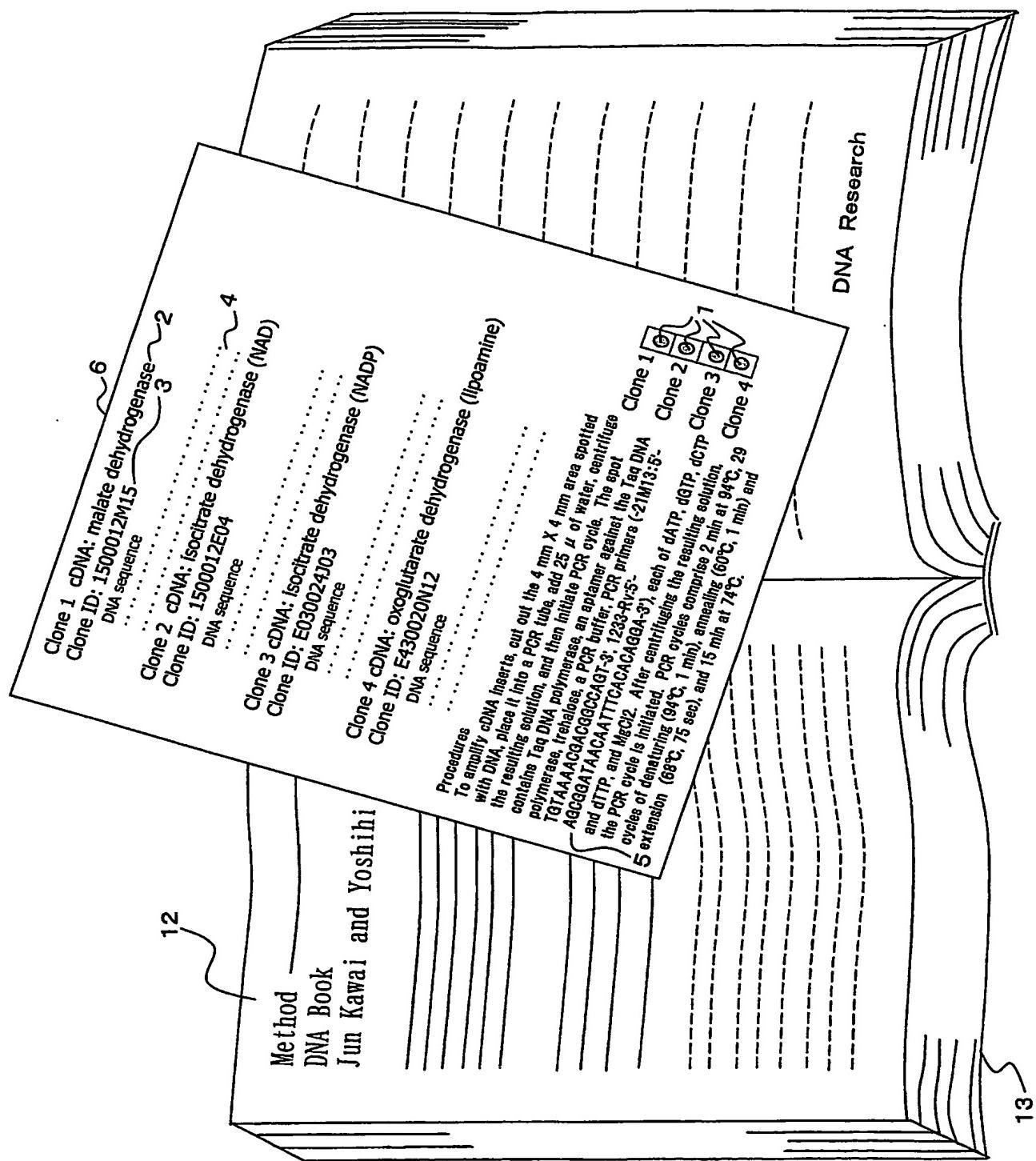
Procedures

To amplify cDNA inserts, cut out the 4 mm X 4 mm area spotted with DNA, place it into a PCR tube, add 25 μ l of water, centrifuge the resulting solution, and then initiate PCR cycle. The spot contains Taq DNA polymerase, an aptamer against the Taq DNA polymerase, trehalose, a PCR buffer, PCR primers (-21M13: 5'-TGTAAAACGACGCCAGT-3', 1233-Rv: 5'-AQCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'), each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP, and MgCl₂. After centrifuging the resulting solution, the PCR cycle is initiated. PCR cycles comprise 2 min at 94°C, 29-cycles of denaturing (94°C, 1 min), annealing (60°C, 1 min) and extension (68°C, 75 sec), and 15 min at 74°C.

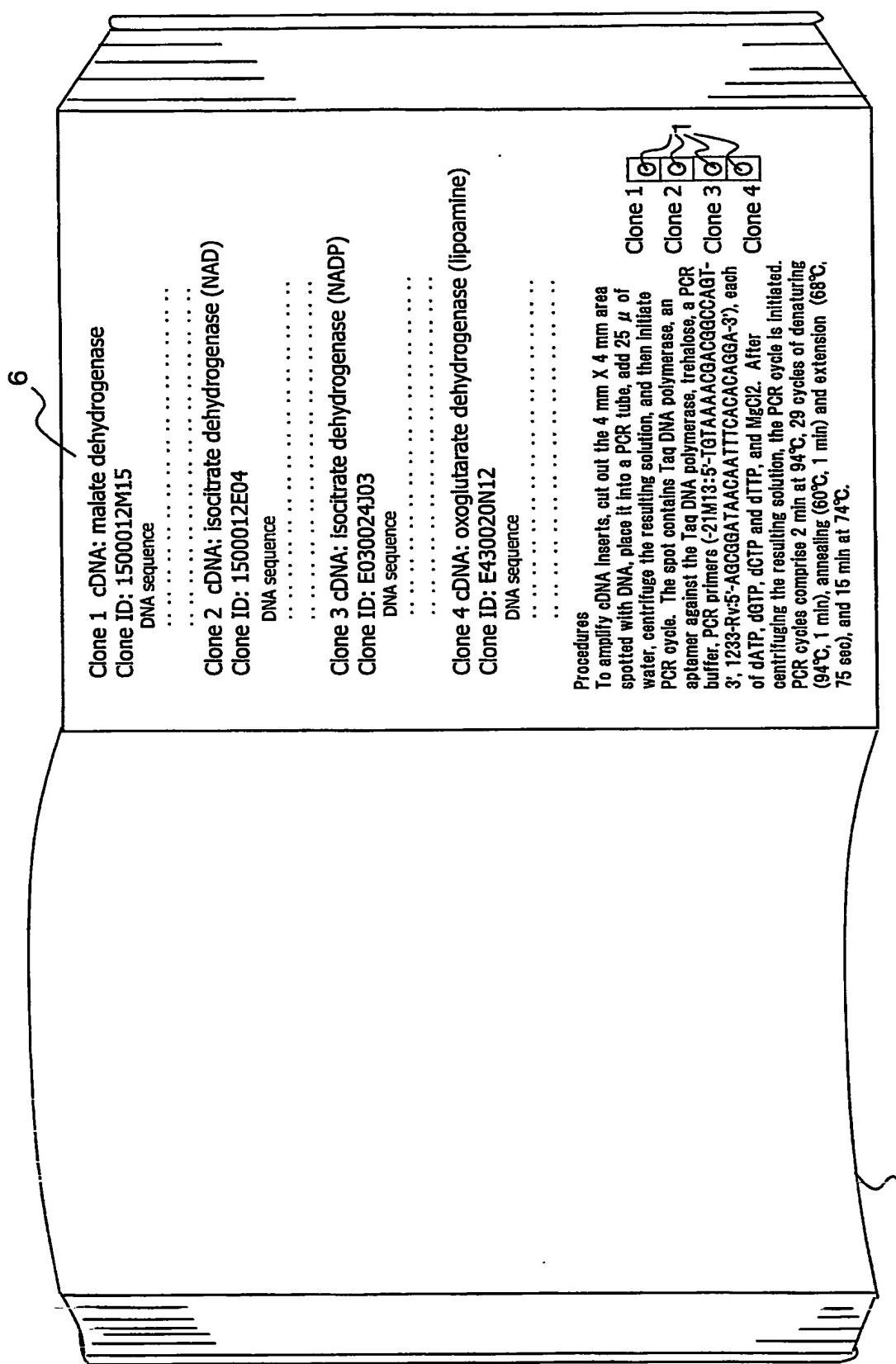


5

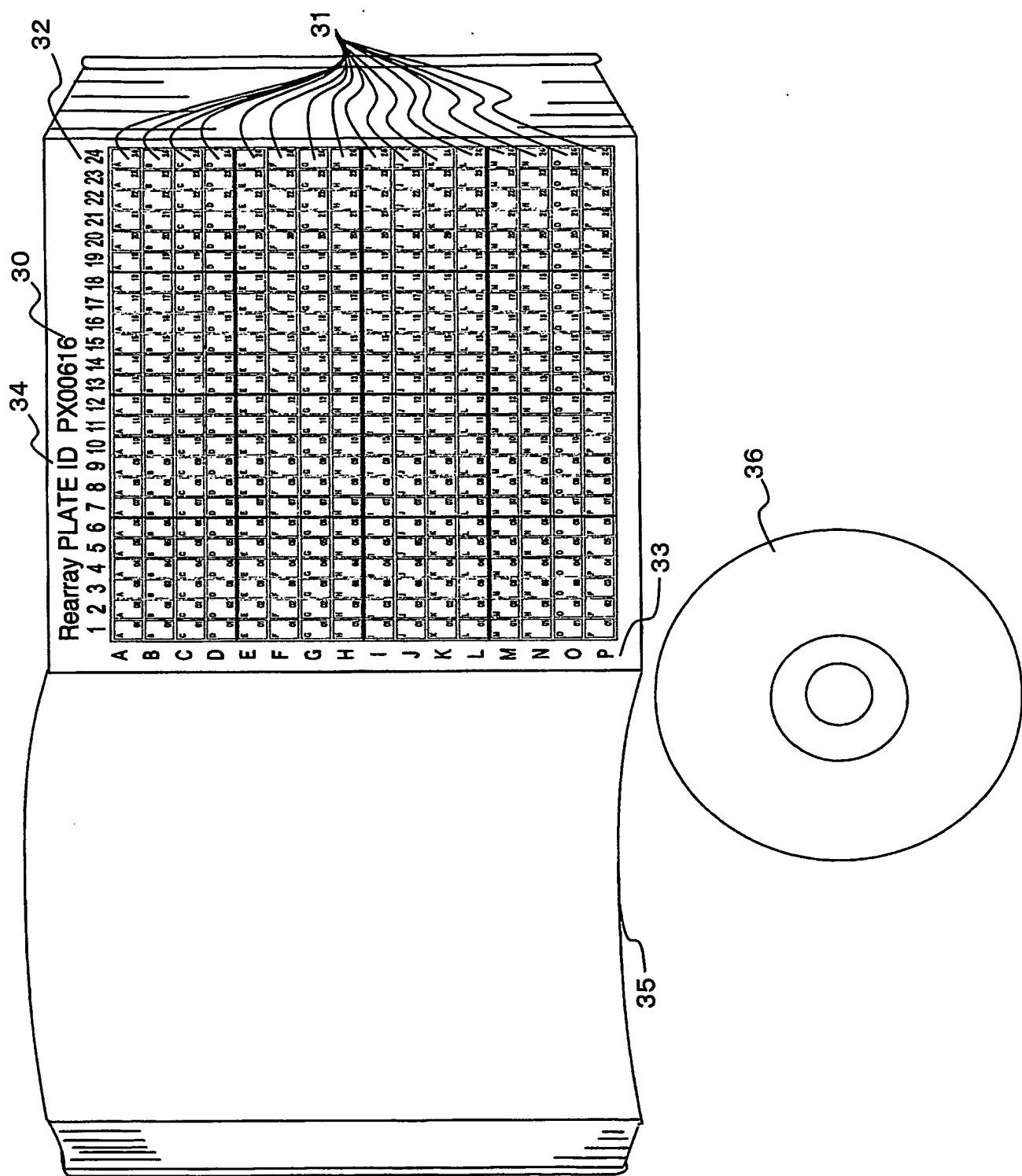
【図2】



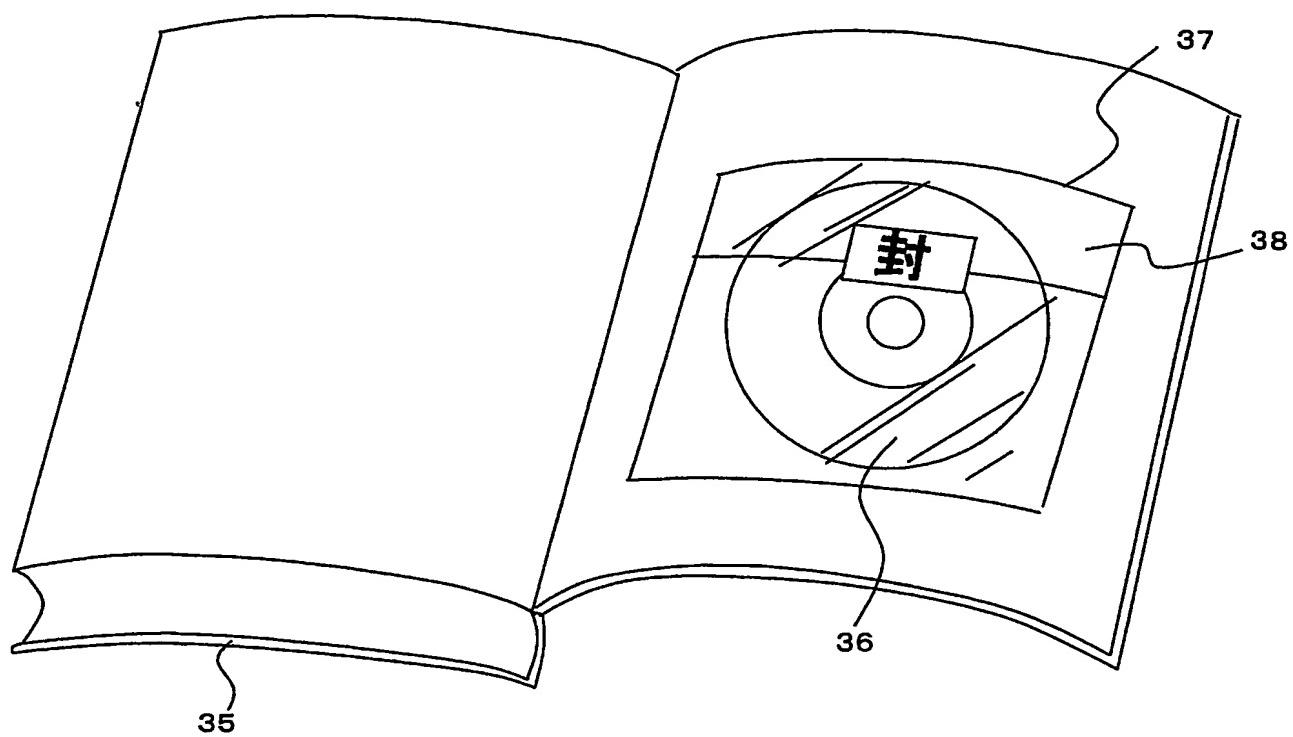
【図3】



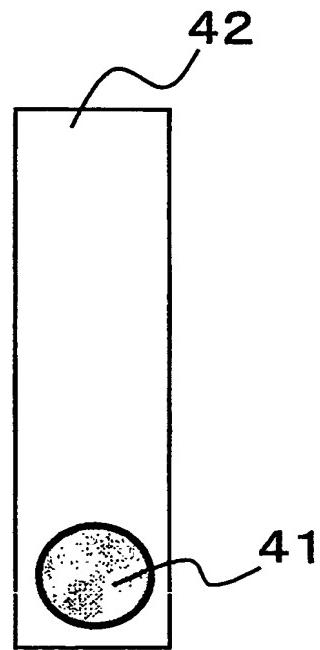
【図4】



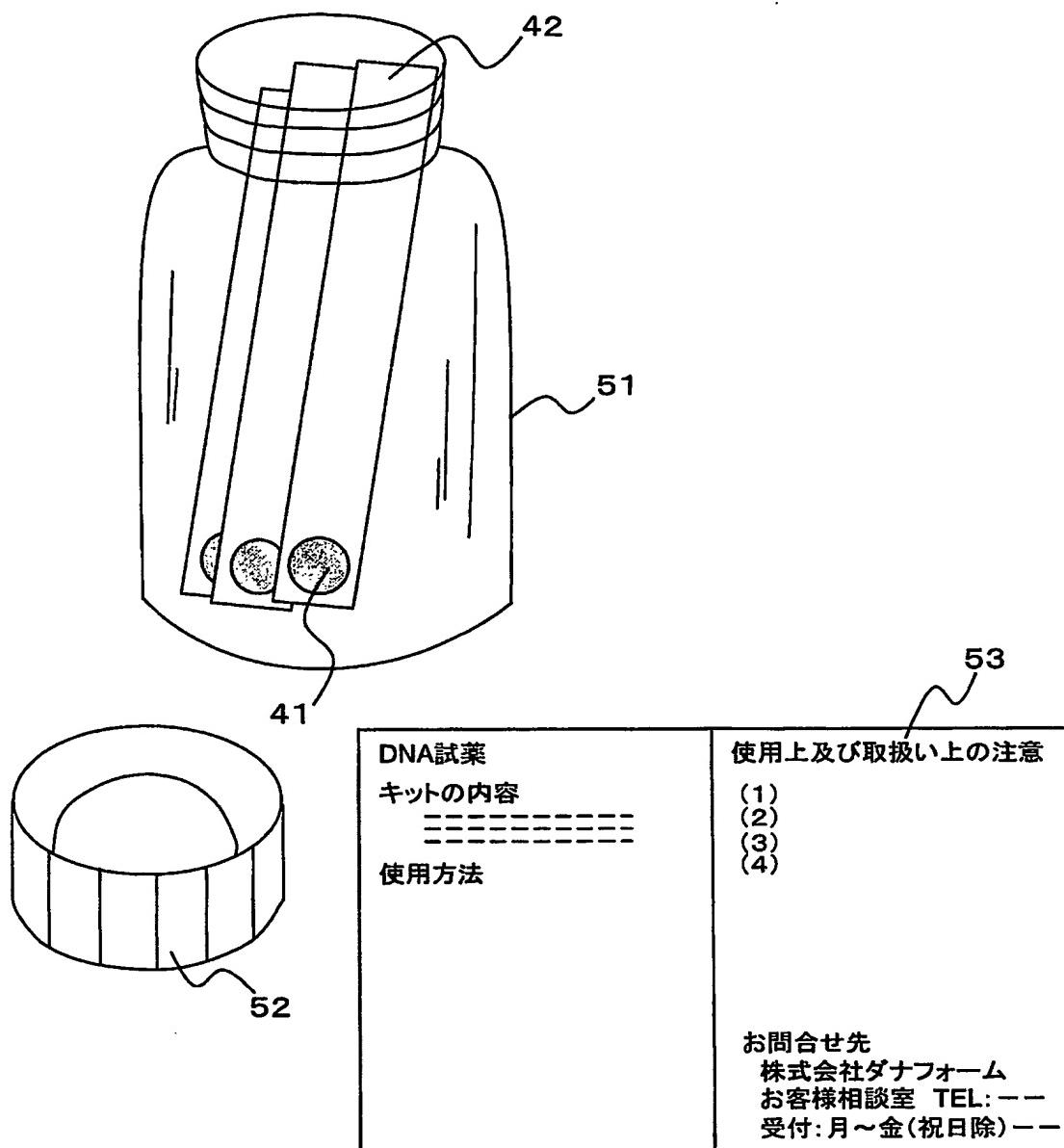
【図5】



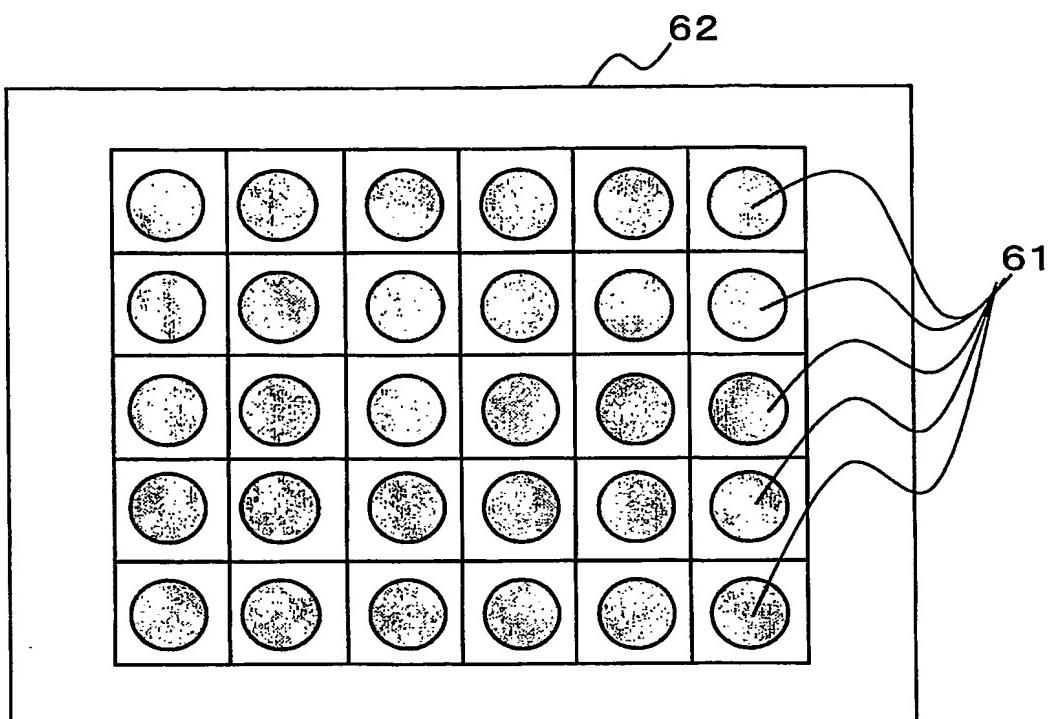
【図6】



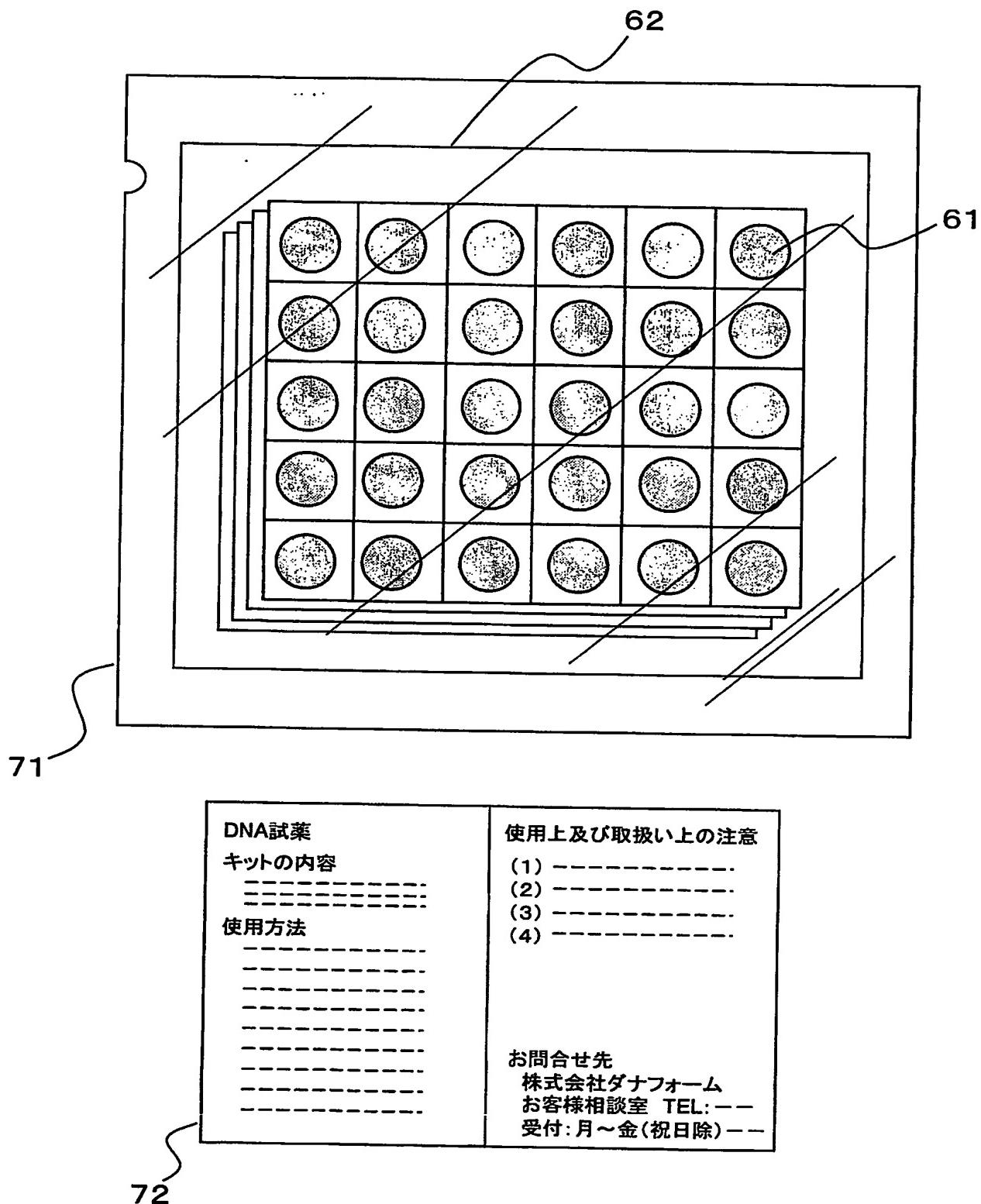
【図7】



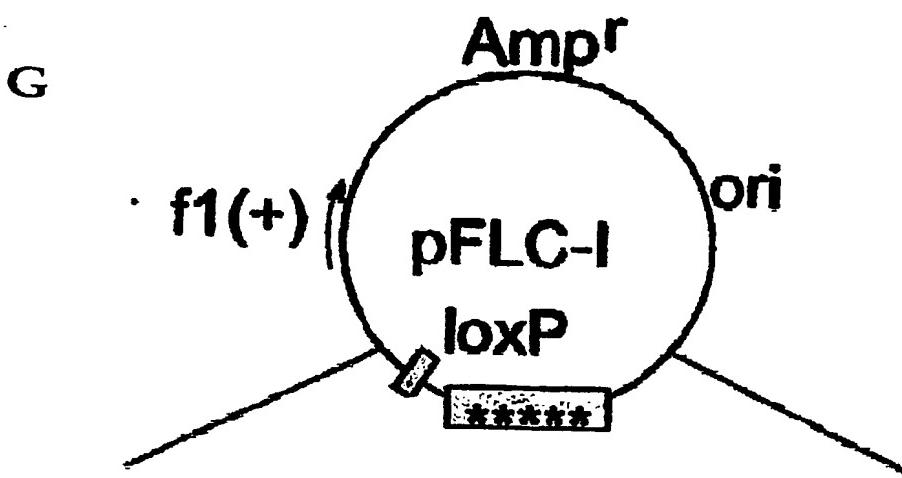
【図8】



【図9】



【図10】



Fwd T7 loxP Sfi I Sal I ***** Bam HI Sfi I T3 Rev
 TGTAACGACGGCCAGTGAATTGTAAATACGACTCACTATAAGGGCGAATTGGAGC
 TCCACCGCCGTGGCGGGCCATTAACCTTCGTATAGCATACATTATAACGAACCTATG
 GATCAGGCCAAATCGGCCGAGCTCGAATTCTGCACGAC*****

 GGATCCGCCATAAGGCC TGATCCTTCGAGGGGGGCCGGTACCAAGCTTTGT
 TCCCTTAGTGAGGGTTAATTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC
 CTGTGIGAAATTGTT

【図 1 1】

cDNA: malate dehydrogenase
Clone ID: 1500012M15

DNA sequence

Amino acid sequence

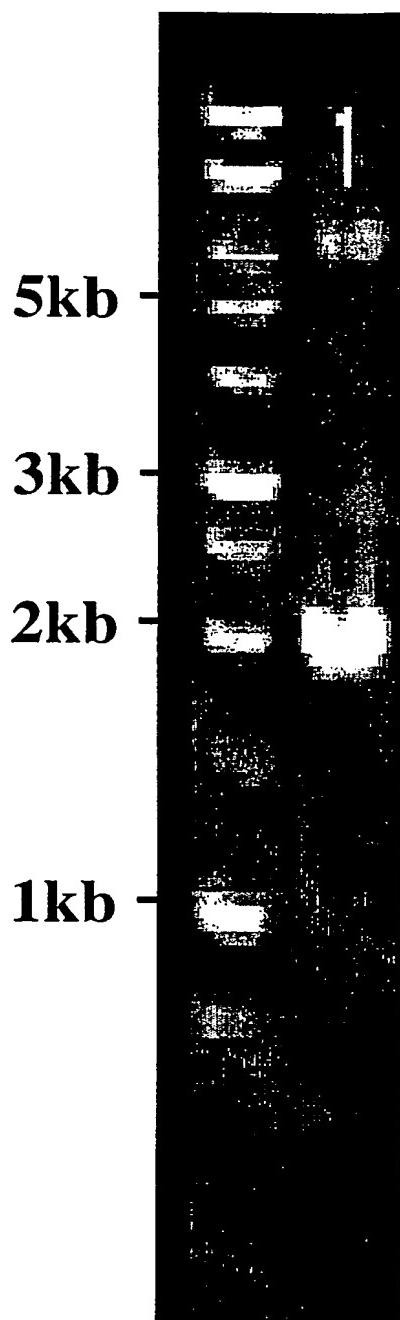
Primer

—21M13 : 5'-TGTAAAACGACGCCAGT-3'
1233-Rv : 5'-AGCGGATAACAATTACACAGGA-3'

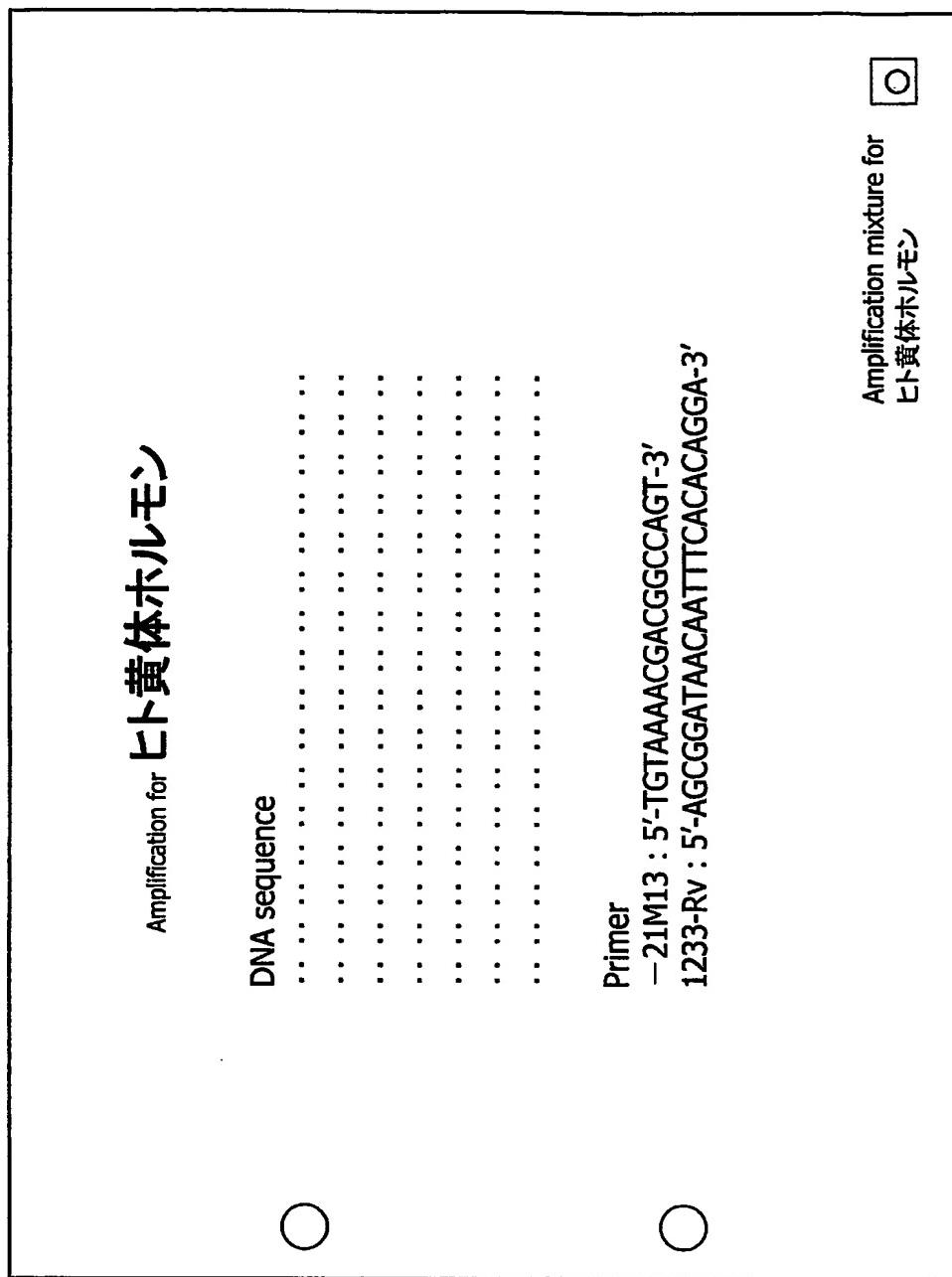
malate dehydrogenase cDNA primers



【図12】

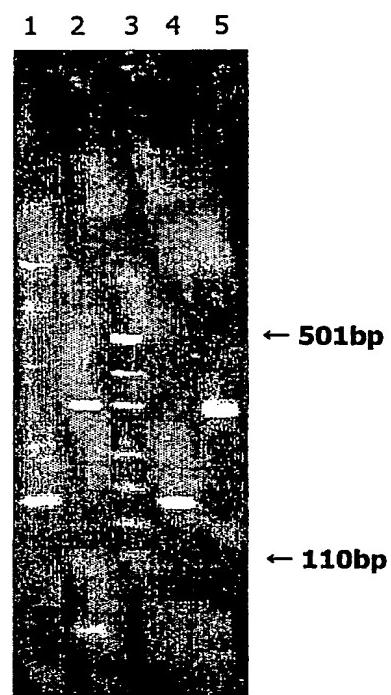


【図 13】



【図14】

- Lane 1:primer set 1, aptamer (-)
Lane 2:primer set 2, aptamer (-)
Lane 3:size marker
Lane 4:primer set 1, aptamer(+)
Lane 5:primer set 2, aptamer(+)



【図15】

Clone 1 cDNA: malate dehydrogenase
Clone ID: 1500012M15

DNA sequence

.....
.....
.....
.....
.....

Clone 2 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NAD)
Clone ID: 1500012E04

DNA sequence

.....
.....
.....
.....
.....

Clone 3 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NADP)
Clone ID: E030024J03

DNA sequence

.....
.....
.....
.....
.....

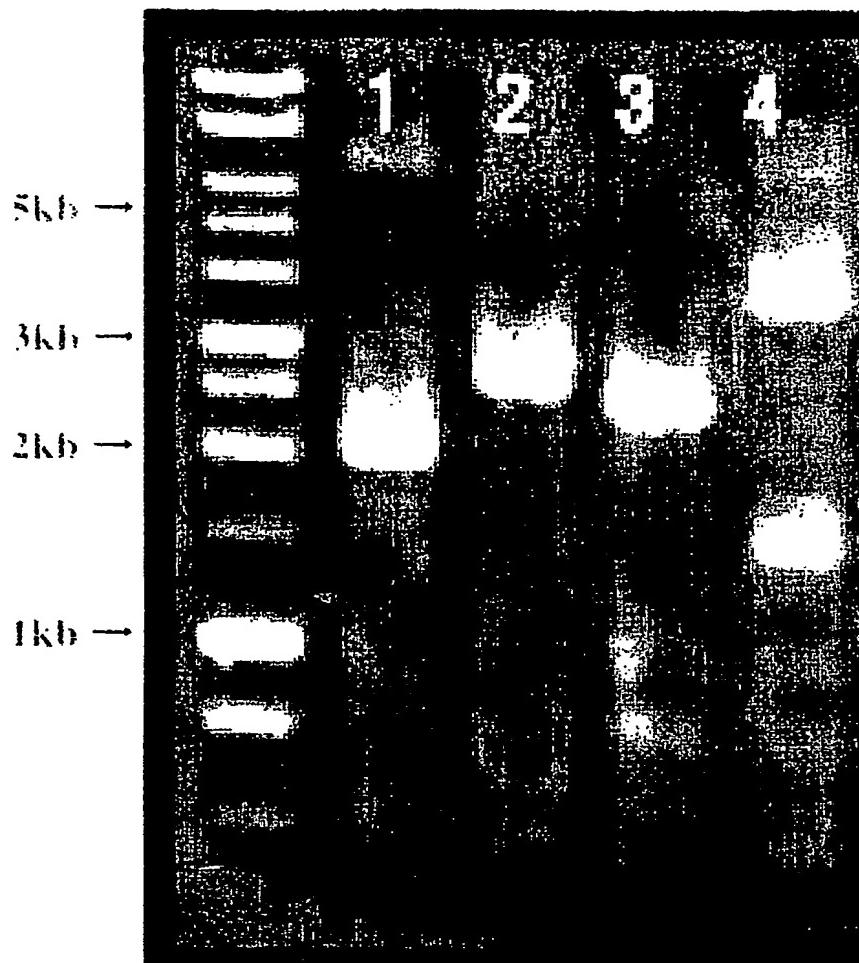
Clone 4 cDNA: oxoglutarate dehydrogenase (lipoamine)
Clone ID: E430020N12

DNA sequence

.....
.....
.....
.....
.....

Clone 1	<input type="radio"/>
Clone 2	<input checked="" type="radio"/>
Clone 3	<input type="radio"/>
Clone 4	<input type="radio"/>

【図16】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 酵素を保存するための簡便な方法を提供すること。

【解決手段】 酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体。該支持体を含む印刷物及び試薬キット。該支持体を製造する方法。該支持体に固定された酵素を再生する方法。
。酵素を保護剤との混合物として支持体に固定した状態で保存する方法。

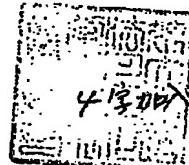
【選択図】 図 1

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成15年12月1日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003-339542
【承継人】
 【識別番号】 503359821
 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号
 【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所
【承継人代理人】
 【識別番号】 100075812
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 吉武 賢次
【提出物件の目録】
 【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
 【援用の表示】 平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件
 にかかる一般承継による特許権の移転登録申請書
 【物件名】 登記簿謄本 1
 【援用の表示】 平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件
 にかかる一般承継による特許権の移転登録申請書
 【物件名】 委任状 1

【物件名】

委任状

【添付書類】



委 任 状

私は、

識別番号 100075812 弁理士 吉 武 寧 次 氏
を代理人と定めて下記事項を委任する。

- 954件
1. 別紙目録に記載の特許出願に関する出願人名義変更届をする件
 2. 上記各項の手続を処理するため復代理人を選任及び解任する件

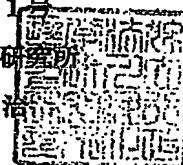
以 上

平成 15 年 11 月 19 日

住所又は居所 埼玉県和光市広沢2番1号

氏名又は名称 独立行政法人 理化学研究所

代 表 者 理事長 野 依 良 治



目録(1)

- | | |
|-------------------------------------|-------------------|
| 1. 特願昭63-235737 | 51. 特願平07-327372 |
| 2. 特願平05-044143 | 52. 特願平08-000652 |
| 3. 特願平05-127257 | 53. 特願平08-026368 |
| 4. 特願平05-127258 | 54. 特願平08-030850 |
| 5. 特願平05-213675 | 55. 特願平08-041279 |
| 6. 特願平05-306164 | 56. 特願平08-045903 |
| 7. 特願平05-328611 | 57. 特願平08-051604 |
| 8. 特願平05-336746 | 58. 特願平08-065715 |
| 9. 特願平06-035100 | 59. 特願平08-070071 |
| 10. 特願平06-061792 | 60. 特願平08-105667 |
| 11. 特願平06-061793 | 61. 特願平08-107784 |
| 12. 特願平06-069150 | 62. 特願平08-116473 |
| 13. 特願平06-097098 | 63. 特願平08-123475 |
| 14. 特願平06-111624 | 64. 特願平08-127005 |
| 15. 特願平06-121100 | 65. 特願平08-131746 |
| 16. 特願平06-145908 | 66. 特願平08-132846 |
| 17. 特願平06-158670 | 67. 特願平08-132854 |
| 18. 特願平06-158671 | 68. 特願平08-142676 |
| 19. 特願平06-165751 | 69. 特願平08-158078 |
| 20. 特願平06-165752 | 70. 特願平08-167401 |
| 21. 特願平06-181857 | 71. 特願平08-196331 |
| 22. 特願平06-235742 | 72. 特願平08-197050 |
| 23. 特願平06-238603 | 73. 特願平08-197051 |
| 24. 特願平06-244764 | 74. 特願平08-211946 |
| 25. 特願平06-248486 | 75. 特願平08-216506 |
| 26. 特願平06-252942 | 76. 特願平08-216508 |
| 27. 特願平06-268723 | 77. 特願平08-222352 |
| 28. 特願平06-293933 | 78. 特願平08-231066 |
| 29. 特願平06-301372 | 79. 特願平08-233442 |
| 30. 特願平06-323795 | 80. 特願平08-236685 |
| 31. 特願平06-324490 | 81. 特願平08-251410 |
| 32. 特願平06-507966 (不許2002-12420) 82. | 特願平08-262051 |
| 33. 特願平07-007185 | 83. 特願平08-302896 |
| 34. 特願平07-069255 | 84. 特願平08-308335 |
| 35. 特願平07-082880 | 85. 特願平08-308336 |
| 36. 特願平07-083142 | 86. 特願平08-311467 |
| 37. 特願平07-117933 | 87. 特願平08-315093 |
| 38. 特願平07-133487 | 88. 特願平08-317622 |
| 39. 特願平07-205141 | 89. 特願平08-320241 |
| 40. 特願平07-214659 | 90. 特願平08-506395 |
| 41. 特願平07-217276 | 91. 特願平09-002295 |
| 42. 特願平07-236185 | 92. 特願平09-010602 |
| 43. 特願平07-240684 | 93. 特願平09-019968 |
| 44. 特願平07-249244 | 94. 特願平09-019969 |
| 45. 特願平07-259922 | 95. 特願平09-019971 |
| 46. 特願平07-282716 | 96. 特願平09-024890 |
| 47. 特願平07-302793 | 97. 特願平09-028982 |
| 48. 特願平07-306004 | 98. 特願平09-046824 |
| 49. 特願平07-311711 | 99. 特願平09-049254 |
| 50. 特願平07-311715 | 100. 特願平09-053478 |

目録(2)

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 101. 特願平09-054595 | 151. 特願平10-045434 |
| 102. 特願平09-056654 | 152. 特願平10-049499 |
| 103. 特願平09-057342 | 153. 特願平10-049867 |
| 104. 特願平09-058774 | 154. 特願平10-051489 |
| 105. 特願平09-067611 | 155. 特願平10-051490 |
| 106. 特願平09-074394 | 156. 特願平10-051491 |
| 107. 特願平09-080480 | 157. 特願平10-051492 |
| 108. 特願平09-082965 | 158. 特願平10-051493 |
| 109. 特願平09-091523 | 159. 特願平10-060740 |
| 110. 特願平09-091591 | 160. 特願平10-060741 |
| 111. 特願平09-091694 | 161. 特願平10-061895 |
| 112. 特願平09-096968 | 162. 特願平10-076139 |
| 113. 特願平09-099061 | 163. 特願平10-085207 |
| 114. 特願平09-099109 | 164. 特願平10-085208 |
| 115. 特願平09-104093 | 165. 特願平10-103083 |
| 116. 特願平09-119730 | 166. 特願平10-103115 |
| 117. 特願平09-129068 | 167. 特願平10-103671 |
| 118. 特願平09-134525 | 168. 特願平10-104093 |
| 119. 特願平09-147964 | 169. 特願平10-113493 |
| 120. 特願平09-155364 | 170. 特願平10-116378 |
| 121. 特願平09-159963 | 171. 特願平10-121456 |
| 122. 特願平09-163630 | 172. 特願平10-127520 |
| 123. 特願平09-163631 | 173. 特願平10-136198 |
| 124. 特願平09-171924 | 174. 特願平10-149603 |
| 125. 特願平09-175896 | 175. 特願平10-150494 |
| 126. 特願平09-180423 | 176. 特願平10-151245 |
| 127. 特願平09-189436 | 177. 特願平10-155838 |
| 128. 特願平09-198201 | 178. 特願平10-155841 |
| 129. 特願平09-208866 | 179. 特願平10-156104 |
| 130. 特願平09-221067 | 180. 特願平10-156108 |
| 131. 特願平09-228345 | 181. 特願平10-198313 |
| 132. 特願平09-230870 | 182. 特願平10-200280 |
| 133. 特願平09-253740 | 183. 特願平10-217132 |
| 134. 特願平09-256795 | 184. 特願平10-217180 |
| 135. 特願平09-271782 | 185. 特願平10-222837 |
| 136. 特願平09-291995 | 186. 特願平10-227939 |
| 137. 特願平09-297084 | 187. 特願平10-229591 |
| 138. 特願平09-307627 | 188. 特願平10-232520 |
| 139. 特願平09-308597 | 189. 特願平10-232590 |
| 140. 特願平09-309848 | 190. 特願平10-236009 |
| 141. 特願平09-327140 | 191. 特願平10-237485 |
| 142. 特願平09-327609 | 192. 特願平10-238144 |
| 143. 特願平09-328742 | 193. 特願平10-245293 |
| 144. 特願平09-360327 | 194. 特願平10-250598 |
| 145. 特願平10-002030 | 195. 特願平10-250611 |
| 146. 特願平10-010471 | 196. 特願平10-252128 |
| 147. 特願平10-014152 | 197. 特願平10-260347 |
| 148. 特願平10-015690 | 198. 特願平10-260416 |
| 149. 特願平10-024892 | 199. 特願平10-268791 |
| 150. 特願平10-043335 | 200. 特願平10-269859 |

目録(3)

- | | | | |
|------|--------------|------|---------------|
| 201. | 特願平10-272529 | 251. | 特願平11-135137 |
| 202. | 特願平10-280351 | 252. | 特願平11-135482 |
| 203. | 特願平10-308533 | 253. | 特願平11-143429 |
| 204. | 特願平10-309765 | 254. | 特願平11-144005 |
| 205. | 特願平10-311673 | 255. | 特願平11-147097 |
| 206. | 特願平10-311674 | 256. | 特願平11-151099 |
| 207. | 特願平10-311675 | 257. | 特願平11-166247 |
| 208. | 特願平10-314856 | 258. | 特願平11-173839 |
| 209. | 特願平10-315751 | 259. | 特願平11-179278 |
| 210. | 特願平10-338896 | 260. | 特願平11-186052 |
| 211. | 特願平10-338897 | 261. | 特願平11-193235 |
| 212. | 特願平10-338898 | 262. | 特願平11-224269 |
| 213. | 特願平10-338899 | 263. | 特願平11-225060 |
| 214. | 特願平10-352428 | 264. | 特願平11-225832 |
| 215. | 特願平10-354665 | 265. | 特願平11-225839 |
| 216. | 特願平10-363297 | 266. | 特願平11-228176 |
| 217. | 特願平10-363329 | 267. | 特願平11-234800 |
| 218. | 特願平10-506788 | 268. | 特願平11-240326 |
| 219. | 特願平10-532832 | 269. | 特願平11-240910 |
| 220. | 特願平10-535583 | 270. | 特願平11-241737 |
| 221. | 特願平11-008183 | 271. | 特願平11-242438 |
| 222. | 特願平11-013380 | 272. | 特願平11-242490 |
| 223. | 特願平11-015178 | 273. | 特願平11-253851 |
| 224. | 特願平11-031724 | 274. | 特願平11-260947 |
| 225. | 特願平11-035776 | 275. | 特願平11-277759 |
| 226. | 特願平11-046372 | 276. | 特願平11-278976 |
| 227. | 特願平11-056835 | 277. | 特願平11-279324 |
| 228. | 特願平11-055867 | 278. | 特願平11-281632 |
| 229. | 特願平11-055930 | 279. | 特願平11-303976 |
| 230. | 特願平11-056957 | 280. | 特願平11-309616 |
| 231. | 特願平11-057381 | 281. | 特願平11-315036 |
| 232. | 特願平11-057749 | 282. | 特願平11-321282 |
| 233. | 特願平11-058103 | 283. | 特願平11-336079 |
| 234. | 特願平11-061079 | 284. | 特願平11-346467 |
| 235. | 特願平11-061080 | 285. | 特願平11-354563 |
| 236. | 特願平11-064193 | 286. | 特願平11-360274 |
| 237. | 特願平11-064372 | 287. | 特願平11-365899 |
| 238. | 特願平11-064506 | 288. | 特願平11-373483 |
| 239. | 特願平11-065136 | 289. | 特願平11-510791 |
| 240. | 特願平11-074385 | 290. | 特願平11-515324 |
| 241. | 特願平11-081225 | 291. | 特願2000-001783 |
| 242. | 特願平11-090383 | 292. | 特願2000-005221 |
| 243. | 特願平11-091875 | 293. | 特願2000-009363 |
| 244. | 特願平11-103231 | 294. | 特願2000-010516 |
| 245. | 特願平11-104509 | 295. | 特願2000-011147 |
| 246. | 特願平11-106920 | 296. | 特願2000-011623 |
| 247. | 特願平11-124187 | 297. | 特願2000-016518 |
| 248. | 特願平11-130771 | 298. | 特願2000-016622 |
| 249. | 特願平11-130814 | 299. | 特願2000-017112 |
| 250. | 特願平11-130815 | 300. | 特願2000-018612 |

目録(4)

301. 特願2000-019195	351. 特願2000-141763
302. 特願2000-019528	352. 特願2000-148843
303. 特願2000-020067	353. 特願2000-152455
304. 特願2000-030321	354. 特願2000-152469
305. 特願2000-034109	355. 特願2000-154484
306. 特願2000-039082	356. 特願2000-161895
307. 特願2000-040355	357. 特願2000-163122
308. 特願2000-041927	358. 特願2000-164584
309. 特願2000-041929	359. 特願2000-179723
310. 特願2000-045318	360. 特願2000-181281
311. 特願2000-045855	361. 特願2000-184259
312. 特願2000-051488	362. 特願2000-184295
313. 特願2000-051650	363. 特願2000-191007
314. 特願2000-052040	364. 特願2000-191265
315. 特願2000-053707	365. 特願2000-192332
316. 特願2000-054949	366. 特願2000-193817
317. 特願2000-056093	367. 特願2000-195384
318. 特願2000-056879	368. 特願2000-196991
319. 特願2000-057564	369. 特願2000-197022
320. 特願2000-057565	370. 特願2000-202801
321. 特願2000-057566	371. 特願2000-216457
322. 特願2000-058133	372. 特願2000-223714
323. 特願2000-058282	373. 特願2000-224970
324. 特願2000-062316	374. 特願2000-225486
325. 特願2000-064142	375. 特願2000-225864
326. 特願2000-064209	376. 特願2000-225978
327. 特願2000-071119	377. 特願2000-226361
328. 特願2000-076122	378. 特願2000-229191
329. 特願2000-085874	379. 特願2000-230551
330. 特願2000-089078	380. 特願2000-237165
331. 特願2000-092693	381. 特願2000-237166
332. 特願2000-100395	382. 特願2000-237533
333. 特願2000-105139	383. 特願2000-246309
334. 特願2000-105917	384. 特願2000-248331
335. 特願2000-107160	385. 特願2000-249232
336. 特願2000-108409	386. 特願2000-256149
337. 特願2000-109638	387. 特願2000-257080
338. 特願2000-109954	388. 特願2000-257083
339. 特願2000-118361	389. 特願2000-260030
340. 特願2000-120874	390. 特願2000-261233
341. 特願2000-123634	391. 特願2000-264743
342. 特願2000-128431	392. 特願2000-265344
343. 特願2000-131049	393. 特願2000-278502
344. 特願2000-131050	394. 特願2000-279557
345. 特願2000-131745	395. 特願2000-292422
346. 特願2000-134427	396. 特願2000-292832
347. 特願2000-136551	397. 特願2000-299812
348. 特願2000-136572	398. 特願2000-307464
349. 特願2000-138977	399. 特願2000-308248
350. 特願2000-141566	400. 特願2000-309581

目録(5)

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 401. 特願2000-319775 | 451. 特願2001-071435 |
| 402. 特願2000-322056 | 452. 特願2001-072650 |
| 403. 特願2000-333311 | 453. 特願2001-072668 |
| 404. 特願2000-334686 | 454. 特願2001-072963 |
| 405. 特願2000-334969 | 455. 特願2001-073028 |
| 406. 特願2000-343912 | 456. 特願2001-074964 |
| 407. 特願2000-347398 | 457. 特願2001-074965 |
| 408. 特願2000-347865 | 458. 特願2001-077257 |
| 409. 特願2000-358121 | 459. 特願2001-078671 |
| 410. 特願2000-368566 | 460. 特願2001-084173 |
| 411. 特願2000-374626 | 461. 特願2001-089541 |
| 412. 特願2000-375090 | 462. 特願2001-091911 |
| 413. 特願2000-378421 | 463. 特願2001-092337 |
| 414. 特願2000-378942 | 464. 特願2001-116171 |
| 415. 特願2000-378950 | 465. 特願2001-124294 |
| 416. 特願2000-384771 | 466. 特願2001-124452 |
| 417. 特願2000-387016 | 467. 特願2001-127575 |
| 418. 特願2000-394815 | 468. 特願2001-127576 |
| 419. 特願2000-396445 | 469. 特願2001-135357 |
| 420. 特願2000-399940 | 470. 特願2001-137087 |
| 421. 特願2000-400336 | 471. 特願2001-138103 |
| 422. 特願2000-401110 | 472. 特願2001-142583 |
| 423. 特願2000-401245 | 473. 特願2001-147081 |
| 424. 特願2000-401258 | 474. 特願2001-152364 |
| 425. 特願2000-503838 | 475. 特願2001-152379 |
| 426. 特願2000-571733 | 476. 特願2001-153447 |
| 427. 特願2000-571943 | 477. 特願2001-155572 |
| 428. 特願2000-602588 | 478. 特願2001-163740 |
| 429. 特願2000-602900 | 479. 特願2001-164819 |
| 430. 特願2000-618709 | 480. 特願2001-164997 |
| 431. 特願2001-003476 | 481. 特願2001-165133 |
| 432. 特願2001-005615 | 482. 特願2001-167910 |
| 433. 特願2001-007979 | 483. 特願2001-168784 |
| 434. 特願2001-016626 | 484. 特願2001-171705 |
| 435. 特願2001-025030 | 485. 特願2001-173331 |
| 436. 特願2001-037141 | 486. 特願2001-174421 |
| 437. 特願2001-037147 | 487. 特願2001-174553 |
| 438. 特願2001-042501 | 488. 特願2001-175898 |
| 439. 特願2001-044933 | 489. 特願2001-178169 |
| 440. 特願2001-047762 | 490. 特願2001-179858 |
| 441. 特願2001-050645 | 491. 特願2001-180552 |
| 442. 特願2001-053550 | 492. 特願2001-180554 |
| 443. 特願2001-054717 | 493. 特願2001-187735 |
| 444. 特願2001-059115 | 494. 特願2001-197185 |
| 445. 特願2001-059892 | 495. 特願2001-197897 |
| 446. 特願2001-060848 | 496. 特願2001-200854 |
| 447. 特願2001-062703 | 497. 特願2001-201356 |
| 448. 特願2001-065799 | 498. 特願2001-202971 |
| 449. 特願2001-065917 | 499. 特願2001-203089 |
| 450. 特願2001-068285 | 500. 特願2001-206505 |

目録(6)

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 501. 特願2001-206522 | 551. 特願2001-325367 |
| 502. 特願2001-206523 | 552. 特願2001-326872 |
| 503. 特願2001-209305 | 553. 特願2001-327853 |
| 504. 特願2001-212947 | 554. 特願2001-329023 |
| 505. 特願2001-216505 | 555. 特願2001-332168 |
| 506. 特願2001-220219 | 556. 特願2001-337467 |
| 507. 特願2001-226176 | 557. 特願2001-339396 |
| 508. 特願2001-228287 | 558. 特願2001-339593 |
| 509. 特願2001-228374 | 559. 特願2001-346035 |
| 510. 特願2001-235412 | 560. 特願2001-347316 |
| 511. 特願2001-235747 | 561. 特願2001-347637 |
| 512. 特願2001-238951 | 562. 特願2001-349614 |
| 513. 特願2001-241023 | 563. 特願2001-351730 |
| 514. 特願2001-243930 | 564. 特願2001-352189 |
| 515. 特願2001-246642 | 565. 特願2001-353038 |
| 516. 特願2001-249976 | 566. 特願2001-358446 |
| 517. 特願2001-254377 | 567. 特願2001-358581 |
| 518. 特願2001-254378 | 568. 特願2001-359710 |
| 519. 特願2001-255589 | 569. 特願2001-374928 |
| 520. 特願2001-256576 | 570. 特願2001-376591 |
| 521. 特願2001-257188 | 571. 特願2001-378757 |
| 522. 特願2001-261158 | 572. 特願2001-380473 |
| 523. 特願2001-266004 | 573. 特願2001-382537 |
| 524. 特願2001-266069 | 574. 特願2001-382539 |
| 525. 特願2001-266454 | 575. 特願2001-382599 |
| 526. 特願2001-267194 | 576. 特願2001-385258 |
| 527. 特願2001-267379 | 577. 特願2001-385512 |
| 528. 特願2001-267863 | 578. 特願2001-385513 |
| 529. 特願2001-272977 | 579. 特願2001-385538 |
| 530. 特願2001-273964 | 580. 特願2001-388116 |
| 531. 特願2001-276053 | 581. 特願2001-390122 |
| 532. 特願2001-279406 | 582. 特願2001-392087 |
| 533. 特願2001-280319 | 583. 特願2001-392088 |
| 534. 特願2001-285145 | 584. 特願2001-395196 |
| 535. 特願2001-291059 | 585. 特願2001-396120 |
| 536. 特願2001-292223 | 586. 特願2001-397762 |
| 537. 特願2001-292224 | 587. 特願2001-397998 |
| 538. 特願2001-293000 | 588. 特願2001-401139 |
| 539. 特願2001-293054 | 589. 特願2001-515803 |
| 540. 特願2001-293936 | 590. 特願2001-523852 |
| 541. 特願2001-294013 | 591. 特願2001-557672 |
| 542. 特願2001-298140 | 592. 特願2002-000993 |
| 543. 特願2001-298402 | 593. 特願2002-005746 |
| 544. 特願2001-307340 | 594. 特願2002-010344 |
| 545. 特願2001-309501 | 595. 特願2002-011558 |
| 546. 特願2001-309508 | 596. 特願2002-019752 |
| 547. 特願2001-309984 | 597. 特願2002-020329 |
| 548. 特願2001-310554 | 598. 特願2002-022499 |
| 549. 特願2001-313430 | 599. 特願2002-028046 |
| 550. 特願2001-319360 | 600. 特願2002-028109 |

目録(7)

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 601. 特願2002-040151 | 651. 特願2002-162157 |
| 602. 特願2002-042829 | 652. 特願2002-162211 |
| 603. 特願2002-044340 | 653. 特願2002-162365 |
| 604. 特願2002-044640 | 654. 特願2002-167759 |
| 605. 特願2002-046188 | 655. 特願2002-170068 |
| 606. 特願2002-047799 | 656. 特願2002-170902 |
| 607. 特願2002-053190 | 657. 特願2002-176435 |
| 608. 特願2002-053575 | 658. 特願2002-176583 |
| 609. 特願2002-055272 | 659. 特願2002-183722 |
| 610. 特願2002-057253 | 660. 特願2002-185966 |
| 611. 特願2002-057565 | 661. 特願2002-187362 |
| 612. 特願2002-057935 | 662. 特願2002-187957 |
| 613. 特願2002-057963 | 663. 特願2002-188281 |
| 614. 特願2002-066249 | 664. 特願2002-189265 |
| 615. 特願2002-070624 | 665. 特願2002-194627 |
| 616. 特願2002-070987 | 666. 特願2002-197812 |
| 617. 特願2002-071924 | 667. 特願2002-201443 |
| 618. 特願2002-074902 | 668. 特願2002-201575 |
| 619. 特願2002-078164 | 669. 特願2002-202118 |
| 620. 特願2002-081467 | 670. 特願2002-205814 |
| 621. 特願2002-081502 | 671. 特願2002-205825 |
| 622. 特願2002-083081 | 672. 特願2002-217714 |
| 623. 特願2002-084139 | 673. 特願2002-221188 |
| 624. 特願2002-085017 | 674. 特願2002-225469 |
| 625. 特願2002-087342 | 675. 特願2002-225724 |
| 626. 特願2002-094681 | 676. 特願2002-226859 |
| 627. 特願2002-095132 | 677. 特願2002-227286 |
| 628. 特願2002-095389 | 678. 特願2002-229686 |
| 629. 特願2002-100431 | 679. 特願2002-230562 |
| 630. 特願2002-106561 | 680. 特願2002-235294 |
| 631. 特願2002-119320 | 681. 特願2002-235737 |
| 632. 特願2002-120371 | 682. 特願2002-236838 |
| 633. 特願2002-123347 | 683. 特願2002-237058 |
| 634. 特願2002-128854 | 684. 特願2002-237092 |
| 635. 特願2002-133717 | 685. 特願2002-248946 |
| 636. 特願2002-133749 | 686. 特願2002-253322 |
| 637. 特願2002-134313 | 687. 特願2002-253689 |
| 638. 特願2002-141187 | 688. 特願2002-253697 |
| 639. 特願2002-141438 | 689. 特願2002-254096 |
| 640. 特願2002-142260 | 690. 特願2002-257924 |
| 641. 特願2002-149471 | 691. 特願2002-260788 |
| 642. 特願2002-149931 | 692. 特願2002-261499 |
| 643. 特願2002-150541 | 693. 特願2002-264969 |
| 644. 特願2002-154688 | 694. 特願2002-267114 |
| 645. 特願2002-154695 | 695. 特願2002-268987 |
| 646. 特願2002-154823 | 696. 特願2002-270917 |
| 647. 特願2002-158237 | 697. 特願2002-271375 |
| 648. 特願2002-158352 | 698. 特願2002-271473 |
| 649. 特願2002-160277 | 699. 特願2002-273996 |
| 650. 特願2002-162148 | 700. 特願2002-274469 |

目録(8)

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 701. 特願2002-276051 | 751. 特願2003-012738 |
| 702. 特願2002-282746 | 752. 特願2003-012774 |
| 703. 特願2002-286487 | 753. 特願2003-015968 |
| 704. 特願2002-289209 | 754. 特願2003-016044 |
| 705. 特願2002-295332 | 755. 特願2003-016940 |
| 706. 特願2002-296911 | 756. 特願2003-017397 |
| 707. 特願2002-299429 | 757. 特願2003-021499 |
| 708. 特願2002-301875 | 758. 特願2003-024347 |
| 709. 特願2002-303838 | 759. 特願2003-024620 |
| 710. 特願2002-312131 | 760. 特願2003-025277 |
| 711. 特願2002-320102 | 761. 特願2003-027647 |
| 712. 特願2002-320704 | 762. 特願2003-027648 |
| 713. 特願2002-325909 | 763. 特願2003-031882 |
| 714. 特願2002-325920 | 764. 特願2003-032932 |
| 715. 特願2002-332232 | 765. 特願2003-038206 |
| 716. 特願2002-339344 | 766. 特願2003-040642 |
| 717. 特願2002-339392 | 767. 特願2003-043961 |
| 718. 特願2002-339541 | 768. 特願2003-050153 |
| 719. 特願2002-339551 | 769. 特願2003-050446 |
| 720. 特願2002-341195 | 770. 特願2003-052520 |
| 721. 特願2002-343807 | 771. 特願2003-052602 |
| 722. 特願2002-344279 | 772. 特願2003-052613 |
| 723. 特願2002-345597 | 773. 特願2003-052877 |
| 724. 特願2002-347401 | 774. 特願2003-053023 |
| 725. 特願2002-348760 | 775. 特願2003-054182 |
| 726. 特願2002-349042 | 776. 特願2003-054798 |
| 727. 特願2002-354594 | 777. 特願2003-054799 |
| 728. 特願2002-357768 | 778. 特願2003-054846 |
| 729. 特願2002-357900 | 779. 特願2003-054847 |
| 730. 特願2002-358019 | 780. 特願2003-054848 |
| 731. 特願2002-358967 | 781. 特願2003-054849 |
| 732. 特願2002-360972 | 782. 特願2003-055452 |
| 733. 特願2002-360975 | 783. 特願2003-056628 |
| 734. 特願2002-368112 | 784. 特願2003-061426 |
| 735. 特願2002-376555 | 785. 特願2003-063532 |
| 736. 特願2002-376774 | 786. 特願2003-065013 |
| 737. 特願2002-376831 | 787. 特願2003-071028 |
| 738. 特願2002-379214 | 788. 特願2003-072979 |
| 739. 特願2002-380624 | 789. 特願2003-074168 |
| 740. 特願2002-381888 | 790. 特願2003-076107 |
| 741. 特願2002-382170 | 791. 特願2003-078999 |
| 742. 特願2002-383870 | 792. 特願2003-079598 |
| 743. 特願2002-521644 | 793. 特願2003-079613 |
| 744. 特願2002-532458 | 794. 特願2003-082466 |
| 745. 特願2002-546564 | 795. 特願2003-083318 |
| 746. 特願2002-548185 | 796. 特願2003-083433 |
| 747. 特願2002-570743 | 797. 特願2003-083480 |
| 748. 特願2003-003450 | 798. 特願2003-085193 |
| 749. 特願2003-012550 | 799. 特願2003-089026 |
| 750. 特願2003-012694 | 800. 特願2003-090331 |

目録(9)

801.	特願 2003-091446	851.	特願 2003-127135
802.	特願 2003-092654	852.	特願 2003-127150
803.	特願 2003-093642	853.	特願 2003-128818
804.	特願 2003-094272	854.	特願 2003-128897
805.	特願 2003-094719	855.	特願 2003-129347
806.	特願 2003-095770	856.	特願 2003-131313
807.	特願 2003-095884	857.	特願 2003-132280
808.	特願 2003-095885	858.	特願 2003-132605
809.	特願 2003-095886	859.	特願 2003-132606
810.	特願 2003-095904	860.	特願 2003-135591
811.	特願 2003-097283	861.	特願 2003-136445
812.	特願 2003-097327	862.	特願 2003-139397
813.	特願 2003-101917	863.	特願 2003-140684
814.	特願 2003-104928	864.	特願 2003-142303
815.	特願 2003-105362	865.	特願 2003-143932
816.	特願 2003-107267	866.	特願 2003-145221
817.	特願 2003-107268	867.	特願 2003-145390
818.	特願 2003-107647	868.	特願 2003-147820
819.	特願 2003-107885	869.	特願 2003-150690
820.	特願 2003-109575	870.	特願 2003-153014
821.	特願 2003-115750	871.	特願 2003-153015
822.	特願 2003-115793	872.	特願 2003-153016
823.	特願 2003-115847	873.	特願 2003-153985
824.	特願 2003-115888	874.	特願 2003-154009
825.	特願 2003-116232	875.	特願 2003-154841
826.	特願 2003-116895	876.	特願 2003-155397
827.	特願 2003-118161	877.	特願 2003-155407
828.	特願 2003-118186	878.	特願 2003-158017
829.	特願 2003-119749	879.	特願 2003-161005
830.	特願 2003-119930	880.	特願 2003-164126
831.	特願 2003-120934	881.	特願 2003-170051
832.	特願 2003-121233	882.	特願 2003-170324
833.	特願 2003-121261	883.	特願 2003-170325
834.	特願 2003-121273	884.	特願 2003-170326
835.	特願 2003-121780	885.	特願 2003-170327
836.	特願 2003-122245	886.	特願 2003-170328
837.	特願 2003-123984	887.	特願 2003-170329
838.	特願 2003-124654	888.	特願 2003-170330
839.	特願 2003-124655	889.	特願 2003-170573
840.	特願 2003-124826	890.	特願 2003-171576
841.	特願 2003-124829	891.	特願 2003-171619
842.	特願 2003-124833	892.	特願 2003-172898
843.	特願 2003-124835	893.	特願 2003-175819
844.	特願 2003-125388	894.	特願 2003-177298
845.	特願 2003-125403	895.	特願 2003-180198
846.	特願 2003-125405	896.	特願 2003-182958
847.	特願 2003-127090	897.	特願 2003-192763
848.	特願 2003-127093	898.	特願 2003-192775
849.	特願 2003-127109	899.	特願 2003-194837
850.	特願 2003-127130	900.	特願 2003-197229

目録(10)

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 901. 特願 2003-198340 | 951. 特願 2003-338191 |
| 902. 特願 2003-204075 | 952. 特願 2003-339542 |
| 903. 特願 2003-205349 | 953. 特願 2003-340181 |
| 904. 特願 2003-205710 | 954. 特願 2003-342519 |
| 905. 特願 2003-206546 | |
| 906. 特願 2003-207698 | |
| 907. 特願 2003-207771 | |
| 908. 特願 2003-207772 | |
| 909. 特願 2003-207850 | |
| 910. 特願 2003-270049 | |
| 911. 特願 2003-271473 | |
| 912. 特願 2003-272421 | |
| 913. 特願 2003-275055 | |
| 914. 特願 2003-277958 | |
| 915. 特願 2003-279130 | |
| 916. 特願 2003-283972 | |
| 917. 特願 2003-284055 | |
| 918. 特願 2003-286640 | |
| 919. 特願 2003-289138 | |
| 920. 特願 2003-293912 | |
| 921. 特願 2003-296474 | |
| 922. 特願 2003-298558 | |
| 923. 特願 2003-299424 | |
| 924. 特願 2003-303979 | |
| 925. 特願 2003-304452 | |
| 926. 特願 2003-304453 | |
| 927. 特願 2003-305689 | |
| 928. 特願 2003-305844 | |
| 929. 特願 2003-306137 | |
| 930. 特願 2003-307564 | |
| 931. 特願 2003-313014 | |
| 932. 特願 2003-315355 | |
| 933. 特願 2003-318801 | |
| 934. 特願 2003-321497 | |
| 935. 特願 2003-322948 | |
| 936. 特願 2003-324974 | |
| 937. 特願 2003-326510 | |
| 938. 特願 2003-327645 | |
| 939. 特願 2003-327907 | |
| 940. 特願 2003-328600 | |
| 941. 特願 2003-328840 | |
| 942. 特願 2003-330418 | |
| 943. 特願 2003-330569 | |
| 944. 特願 2003-331848 | |
| 945. 特願 2003-332756 | |
| 946. 特願 2003-333798 | |
| 947. 特願 2003-333932 | |
| 948. 特願 2003-334036 | |
| 949. 特願 2003-334083 | |
| 950. 特願 2003-336365 | |

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-339542
受付番号	20308550945
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	小松 清 1905
作成日	平成16年 3月26日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
---------	-----------------	---

特願 2003-339542

出願人履歴情報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住所 埼玉県和光市広沢2番1号
氏名 理化学研究所

特願 2003-339542

出願人履歴情報

識別番号 [501293666]

1. 変更年月日 2002年 3月26日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都港区三田1丁目3番35号
氏 名 株式会社ダナフォーム

特願 2003-339542

出願人履歴情報

識別番号 [503359821]

1. 変更年月日 2003年10月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 埼玉県和光市広沢2番1号
氏名 独立行政法人理化学研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.